

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**Faculdade de Ciências**

Departamento de Química e Bioquímica



**Síntese e estudo cinético de potenciais pró-fármacos para  
aplicação em MDEPT**

**Ana Maria Leal Sousa**

Dissertação

Mestrado em Bioquímica

Especialização em Bioquímica

2012



**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**Faculdade de Ciências**

Departamento de Química e Bioquímica



**Síntese e estudo cinético de potenciais pró-fármacos para  
aplicação em MDEPT**

**Ana Maria Leal Sousa**

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria Eduarda Romãozinho de  
Almeida Esteves Mendes e pela Professora Doutora Maria Teresa Troina  
Pamplona

Mestrado em Bioquímica

Especialização em Bioquímica

2012



---

## Agradecimentos

Este ano que passou foi uma longa aventura e após todo o trabalho experimental e escrito, não posso deixar de agradecer a um conjunto de pessoas que foram bastante importantes para o meu crescimento pessoal e profissional:

À Faculdade de Ciências, de quem me orgulho muito, por me ter dado a oportunidade de integrar no Mestrado em Bioquímica e por me ter ensinado a pensar como investigadora.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Eduarda Mendes por me ter aceitado neste projeto, por ter acreditado que era capaz de o realizar e por ter estado sempre disponível. Por toda a simpatia, calma e força, por me ter posto à vontade em todos os passos do trabalho e por me ter transmitido conhecimento.

À Professora Doutora Maria Teresa Pamplona, por ter sido minha orientadora interna, pela sua disponibilidade e por me ter ajudado na última fase da escrita.

À Doutora Maria Manuela Gaspar, por me ter ensinado todo o procedimento que envolvia os lipossomas, por me ter feito gostar de uma nova área de investigação. Pela rapidez e prontidão em todas as alturas em que necessitava de ajuda.

Em particular à Professora Doutora Maria de Jesus Perry, porque em todos os dias no laboratório ensinou-me algo diferente, fez-me pensar naquilo que estava a fazer, por me ter dado lições de vida que levo comigo e à Professora Doutora Ana Paula Francisco por me ter ajudado quando mais precisava.

Ao grupo de Química Medicinal do iMED por todo o material e equipamento disponibilizado e por me terem recebido bem.

Muito e em especial, ao Rafael por ter sido a pessoa desde o primeiro dia a mostrar-se disponível, pronto para ajudar e por ter partilhado tantas ideias. Por me ter transmitido muito conhecimento, tirado dúvidas e por ser um exemplo a seguir como investigador que tem gosto naquilo que faz.

Às companheiras de laboratório e de almoço, Margarida, Telma e Rita por terem sido para além de colegas, amigas, por terem criado momentos de alegria, brincadeira, por terem sido um ponto de apoio e de desabafo nas alturas mais difíceis. Aos meus pais, irmãos, cunhadas e sobrinhos, por me terem dado muito apoio, mostrarem-se interessados no meu trabalho e darem o seu valor e reconhecimento. Por me terem proporcionado novas

---

experiências, momentos genuínos de cumplicidade, por fazerem parte da minha educação e por serem os meus portos de abrigo.

À minha amiga Catarina por ter estado presente em todos os momentos, por me ter aturado enquanto falava do meu trabalho e ao meu amigo Marcelo por ser o meu confidente. Também por me ter dado dicas ao longo do trabalho e por me ter ajudado, com as suas palavras, a ultrapassar alguns dos obstáculos.

A todos os meus amigos e colegas, que fizeram parte do meu percurso e que com certeza estarão presentes em muitos mais momentos da minha vida.

---

## Resumo

Nesta dissertação vários pró-fármacos de triazenos anti tumorais foram sintetizados e avaliados, de forma a compreender a sua potencial aplicação na estratégia MDEPT (*Melanocyte-Directed Enzyme Prodrug Therapy*). Esta é uma das estratégias possíveis para o tratamento do melanoma maligno, um dos tipos de cancro da pele mais agressivos.

Os pró-fármacos sintetizados **18a-f**, **19a,b** e **20a,b** são constituídos por um agente alquilante, um derivado de monometiltriazeno **21** (MMT), ligado a um transportador (ácido 5-(4-hidroxifenil)pentanóico, N-(terc-Butoxicarbonil)-L-tirosina e cloridrato de tirosina, respetivamente) através de uma ligação amida. Foram usadas duas metodologias diferentes, que envolveram a ativação do grupo ácido carboxílico da metade transportadora. A metodologia onde se usou como agente ativante um derivado da triazina mostrou ser mais eficiente (rendimentos de 20 e 26 %) em relação à metodologia com a diciclohexilcarbodiimida (DCC) (8 a 18 %).

Para melhorar as propriedades de solubilidade e de estabilidade, os pró-fármacos **18a** e **18d** foram incorporados em lipossomas. Foram usados diferentes tipos de formulações – fosfatidilcolina (PC), – mistura de PC com fosfatidilglicerol (PG) (7:3), – dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e – mistura de DMPC com dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) (7:3). A estabilidade dos pró-fármacos incorporados foi testada a partir da formulação com melhores parâmetros de incorporação.

Dos pró-fármacos sintetizados foram avaliados cineticamente os pró-fármacos **18** e **19**. Estes mostraram ser estáveis quimicamente em tampão fosfato salino a pH fisiológico ( $48 \leq t_{1/2}(h) \leq 182$ , e alguns estáveis durante 2 semanas). A maioria apresentou uma hidrólise lenta no plasma humano ( $8 \leq t_{1/2}(h) \leq 229$ ). Apenas os pró-fármacos **18** mostraram ser bons substratos para o enzima tirosinase ( $0,7 \leq t_{1/2}(min) \leq 6$ ) com libertação do agente citotóxico (MMT). A estabilidade dos pró-fármacos incorporados aumentou consideravelmente em relação aos pró-fármacos livres (aumento do tempo de meia-vida) nos diversos meios.

Este trabalho permitiu-nos concluir que os pró-fármacos de triazenos **18** são promissores para aplicação na terapêutica MDEPT, uma vez que apresentam grande estabilidade em condições fisiológicas, uma excelente afinidade para a tirosinase, com libertação do respetivo agente citotóxico MMT.

Palavras-chave: MDEPT, tirosinase, triazenos, pró-fármacos, lipossomas





---

## Abstract

In this thesis, a new serie of anti tumor triazene prodrugs was synthesized and evaluated concerning their potencial application in MDEPT (*Melanocyte-Directed Enzyme Prodrug Therapy*). This is one of the possibility strategies of malignant melanoma, a type of aggressive skin cancer.

Prodrugs **18a-f**, **19a,b** and **20a,b** have an alkylating agent, the monomethyltriazene derivate **21** (MMT), linked to a transporter (5-(4-hydroxyphenyl)pentanoic acid, N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-tyrosine, hydrochloride tyrosine, respectively) by an amide linkage. In the synthesis of prodrugs **18**, the amide-bond formation was carried out by two different methodologies, which involved carboxylic acid activation. The 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMTMM) methodology was more efficient (20 and 26 %, yields) than dicyclohexylcarbodiimide (DCC) methodology (8 to 18 %).

In order to improve some solubility and stability properties, prodrugs **18a** and **18d** were incorporated in liposomes. Four types of formulations were used – phosphatidylcholine (PC), – a misture of PC and phosphatidylglycerol (PG) (7:3), – dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and – a misture of DMPC and dimyristoyl phosphatidylglycerol (DMPG) (7:3). The stability of the two incorporated prodrugs was tested from the formulation with the best parameter values for incorporation.

Prodrugs **18** and **19** showed to be chemically stable in isotonic phosphate buffer at physiologic pH ( $48 \leq t_{1/2}(h) \leq 182$ , and some were even stable for 2 weeks). Most prodrugs showed to be slowly hydrolyzed in human plasma ( $8 \leq t_{1/2}(h) \leq 229$ ). Only prodrugs **18** (5-(4-hydroxyphenyl)pentanoic acid derivatives) revealed to be good tyrosinase substrates ( $0.7 \leq t_{1/2}(\text{min}) \leq 6$ ) with release of citotoxic agent (MMT). The stability of incorporated prodrugs increase compared to free prodrugs.

In conclusion, triazene prodrugs **18** are promising compounds for application in MDEPT strategy, as they have a good stability, an excellent tyrosinase affinity and an efficient release of citotoxic agent MMT.

Keywords: MDEPT, tyrosinase, triazenes, prodrug, liposomes



---

# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>i</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Índice</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>xi</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>xv</b>
<b>Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Símbolos</b> .....	<b>xii</b>
<b>Capítulo 1 – Introdução Geral</b> .....	<b>1</b>
1.1 Cancro da Pele .....	<b>2</b>
1.2 Melanoma Maligno .....	<b>2</b>
1.3 Tratamento do Melanoma Maligno .....	<b>3</b>
1.4 Triazenos .....	<b>5</b>
1.4.1 Triazenos como Pró-fármacos .....	<b>7</b>
1.5 Tirosinase .....	<b>10</b>
1.6 MDEPT .....	<b>13</b>
1.7 Lipossomas .....	<b>20</b>
1.7.1 Materiais dos lipossomas .....	<b>21</b>
1.7.2 Características dos lipossomas .....	<b>21</b>
1.7.3 Preparação de lipossomas .....	<b>22</b>
1.7.4 Uso de lipossomas em MDEPT .....	<b>22</b>
1.8 Objetivos do Trabalho .....	<b>23</b>
<b>Capítulo 2 – Procedimento Experimental</b> .....	<b>25</b>
2.1 Equipamentos .....	<b>26</b>
2.2 Reagentes e Solventes .....	<b>27</b>
2.3 Síntese dos Pró-Fármacos .....	<b>28</b>
2.3.1 Metodologia 1 – Reação com N, N'-d ciclohexilcarbodiimida (DCC) .....	<b>28</b>

---

2.3.1.1 Metodologia 1a .....	28
2.3.1.2 Metodologia 1b – Desbloqueamento do grupo BOC .....	28
2.3.2 Metodologia 2 – Reação com N-metilmorfolina/2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (DMTMM) .....	29
2.3.3 Caracterização Estrutural dos Pró-fármacos .....	31
2.4 Influência da incorporação de pró-fármacos em lipossomas .....	33
2.4.1 Preparação de Lipossomas .....	33
2.4.2 Quantificação de fosfolípidos – Método de Rouser .....	34
2.4.3 Quantificação do pró-fármaco .....	34
2.4.4 Caracterização físico-química das formulações lipossomais .....	35
2.4.4.1 Razões de pró-fármaco/lípido .....	35
2.4.4.2 Eficácia de Incorporação .....	35
2.4.4.3 Determinação do tamanho médio .....	36
2.4.4.4 Determinação do potencial-zeta dos lipossomas .....	36
2.5 Avaliação dos compostos como pró-fármacos de triazenos .....	37
2.5.1 Determinação do comprimento de onda máximo de absorção dos pró-fármacos .....	37
2.5.2 Estudos Cinéticos em Tampão Fosfato Salino .....	37
2.5.3 Estudos Cinéticos em Plasma Humano .....	39
2.5.4 Estudos Cinéticos com Enzima Tirosinase .....	39
2.5.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos para os pró-fármacos .....	39
2.5.5 Estudos Cinéticos com Formulações Lipossomais .....	41
2.5.6 Curvas de Calibração .....	42
2.5.7 Determinação dos Coeficientes de Partilha .....	42
<b>Capítulo 3 – Síntese de Pró-fármacos de Triazenos .....</b>	<b>43</b>
3.1 Introdução .....	44
3.1.1 Ativação do Ácido Carboxílico .....	46
3.1.1.1 Ativação com DCC .....	46
3.1.1.2 Ativação com DMTMM .....	47

---

---

3.1.2 Ativação do Grupo Amina .....	48
3.2 Resultados e Discussão .....	49
3.2.1 Síntese de Pró-fármacos de Triazenos .....	49
3.2.2 Caracterização Espectroscópica .....	50
3.3 Conclusões .....	53
<b>Capítulo 4 – Incorporação de Pró-fármacos em Lipossomas .....</b>	<b>55</b>
4.1 Introdução .....	56
4.2 Resultados e Discussão .....	57
4.3 Conclusões .....	60
<b>Capítulo 5 – Avaliação dos compostos como Pró-fármacos de Triazenos .....</b>	<b>61</b>
5.1 Introdução .....	62
5.2 Resultados e Discussão .....	63
5.2.1 Escolha das condições ideais para os estudos de HPLC .....	63
5.2.2 Estudo Cinético em Tampão Fosfato Salino .....	63
5.2.3 Estudo Cinético em Plasma Humano .....	67
5.2.3.1 Influência do substituinte no anel aromático da metade triazénica ....	71
5.2.4 Estudo Cinético com Enzima Tirosinase .....	72
5.2.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos para os pró-fármacos .....	76
5.2.5 Determinação dos Coeficientes de Partilha .....	78
5.3 Conclusões .....	79
5.4 Perspetivas Futuras .....	81
<b>Bibliografia .....</b>	<b>83</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>91</b>

---



---

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> – Representação ilustrativa do melanoma e das células que lhe dão origem. Adaptado de [9] .....	<b>2</b>
<b>Figura 1.2</b> – Estrutura química geral do anti tumoral triazeno <b>1</b> . .....	<b>5</b>
<b>Figura 1.3</b> – Síntese de triazenos. A partir de anilinas (i) e de azidas alquílicas (ii). .....	<b>5</b>
<b>Figura 1.4</b> – Estrutura química do primeiro triazeno sintetizado <b>2</b> e do triazeno <b>3</b> sintetizado por Clarke <i>et al.</i> .....	<b>5</b>
<b>Figura 1.5</b> – Estrutura de 5-amino-imidazol-4-carboxamida <b>4</b> , 5-(3,3-dimetil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida <b>5</b> (dacarbazina, DTIC) e temozolomide (TMZ) <b>6</b> . .....	<b>6</b>
<b>Figura 1.6</b> – Mecanismo de ativação da dacarbazina (DTIC) e temozolomide (TMZ) e mecanismo de alquilação do DNA. Adaptado de [17] .....	<b>8</b>
<b>Figura 1.7</b> – Estrutura tridimensional do enzima tirosinase (PDB ID. 1WX2) (retirado de [28]) .....	<b>10</b>
<b>Figura 1.8</b> – Representação da biossíntese da melanina. Adaptado de [2] .....	<b>11</b>
<b>Figura 1.9</b> – Esquemas das abordagens <i>Achilles heel</i> e <i>Trojan horse</i> (Legenda: S – substrato; Q – quinona; X – agente citotóxico; C – produto cíclico). Adaptado de [8] .....	<b>12</b>
<b>Figura 1.10</b> – Pró-fármaco <b>7</b> sintetizado (Fármaco = mostarda de azoto) por Jordan <i>et al.</i> [33] .....	<b>13</b>
<b>Figura 1.11</b> – Mecanismo de libertação do fármaco através do enzima tirosinase, proposto por Jordan <i>et al.</i> (Fármaco = mostarda de azoto). Adaptado de [33] .....	<b>14</b>
<b>Figura 1.12</b> – Pró-fármacos <b>8-14</b> sintetizados por Jordan <i>et al.</i> [34] .....	<b>15</b>
<b>Figura 1.13</b> – Pró-fármacos <b>15</b> e <b>16</b> sintetizados por Knaggs <i>et al.</i> Adaptado de [35] .....	<b>16</b>
<b>Figura 1.14</b> – Mecanismo de libertação do fármaco <b>15</b> através do enzima tirosinase, proposto por Knaggs <i>et al.</i> (Fármaco = mostarda de azoto). Adaptado de [35] .....	<b>16</b>
<b>Figura 1.15</b> – Mecanismo de libertação do fármaco <b>16</b> através do enzima tirosinase, proposto por Knaggs <i>et al.</i> (Fármaco = mostarda de azoto). Adaptado de [35] .....	<b>17</b>
<b>Figura 1.16</b> – Pró-fármacos sintetizados por Perry <i>et al.</i> [36] .....	<b>17</b>
<b>Figura 1.17</b> – Mecanismo de libertação do fármaco através do enzima tirosinase, proposto por Perry <i>et al.</i> . Adaptado de [36] .....	<b>18</b>
<b>Figura 1.18</b> – Estrutura de um lipossoma. Adaptado de [42] .....	<b>20</b>

<b>Figura 1.19</b> – Pró-fármacos <b>18</b> , <b>19</b> e <b>20</b> sintetizados (X = CN ( <b>18a,19a,20a</b> ), COOCH <sub>3</sub> ( <b>18b,19b,20b</b> ), CONH <sub>2</sub> ( <b>18c</b> ), COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ( <b>18d</b> ), COCH <sub>3</sub> ( <b>18e</b> ), CH <sub>3</sub> ( <b>18f</b> )).	<b>23</b>
<b>Figura 2.1</b> – Espectros de Absorção dos pró-fármacos <b>18a-f</b> e <b>19a,b</b> entre 200 e 400 nm.	<b>37</b>
<b>Figura 2.2</b> – Variação do ln(área) ao longo do tempo no ensaio cinético em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4 a 37 °C do pró-fármaco <b>18a</b> .	<b>38</b>
<b>Figura 3.1</b> – Representação da ligação amida.	<b>44</b>
<b>Figura 3.2</b> – Pró-fármacos <b>18</b> sintetizados.	<b>44</b>
<b>Figura 3.3</b> – Pró-fármacos <b>19</b> sintetizados.	<b>44</b>
<b>Figura 3.4</b> – Pró-fármacos <b>20</b> sintetizados.	<b>44</b>
<b>Figura 3.5</b> – Ativação do ácido carboxílico.	<b>45</b>
<b>Figura 3.6</b> – Ativação do ácido carboxílico pelo agente de acoplamento DCC. Adaptado de [49]	<b>46</b>
<b>Figura 3.7</b> – Formação da ligação amida através da ativação pelo agente de acoplamento DCC e o catalisador DMAP. Adaptado de [51]	<b>47</b>
<b>Figura 3.8</b> – Formação da ligação amida através da ativação com DMTMM. Adaptado de [51]	<b>48</b>
<b>Figura 3.9</b> – Ativação da ligação amida com ativação do grupo amina.	<b>48</b>
<b>Figura 3.10</b> – Ampliação do espectro de <sup>1</sup> H-RMN do pró-fármaco <b>18a</b> . Sistemas AA'XX' e AA'BB', dos prótons dos aromáticos do transportador e do MMT, respectivamente.	<b>51</b>
<b>Figura 5.1</b> – Degradação dos pró-fármacos. (X = CN ( <b>18a,19a</b> ), COOCH <sub>3</sub> ( <b>18b,19b</b> ), CONH <sub>2</sub> ( <b>18c</b> ), COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ( <b>18d</b> ), COCH <sub>3</sub> ( <b>18e</b> ), CH <sub>3</sub> ( <b>18f</b> ), Y = derivado do ácido hidroxifenil pentanóico ( <b>18</b> ); e do N-(terc-Butoxicarbonil)-L-tirosina ( <b>19</b> )). Adaptado de [60]	<b>62</b>
<b>Figura 5.2</b> – Cromatogramas a diferentes tempos (0 e 100 horas) do ensaio cinético em tampão fosfato salino (0,01 M pH 7,4) a 37 °C do pró-fármaco <b>18a</b> (t <sub>retenção</sub> CN-Amina = 1,74 min, t <sub>retenção</sub> CN-MMT= 2,39 min, t <sub>retenção</sub> PF= 9,35 min).	<b>63</b>
<b>Figura 5.3</b> – Variação da concentração (μM) do pró-fármaco <b>18a</b> no ensaio cinético em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4 a 37 °C ao longo do tempo.	<b>64</b>
<b>Figura 5.4</b> – Pró-fármacos aminoaciltriazenos <b>23</b> . Retirado de [53]	<b>65</b>
<b>Figura 5.5</b> – Pró-fármacos N-acil-aminoácido <b>24</b> . Retirado de [13]	<b>65</b>
<b>Figura 5.6</b> – Cromatogramas a diferentes tempos (0, 6 e 26 horas) do ensaio cinético em plasma humano 80% (v/v) do pró-fármaco <b>18a</b> (t <sub>retenção</sub> CN-Amina=1,73 min, t <sub>retenção</sub> CN-MMT=2,78 min, t <sub>retenção</sub> PF=9,43 min).	<b>67</b>



---

<b>Figura 5.7</b> – Variação das concentrações ( $\mu\text{M}$ ) do pró-fármaco <b>18a</b> , monometiltriazeno (CN-MMT) e respetiva amina (CN-Amina), em plasma humano 80% (v/v) ao longo do tempo. ....	<b>68</b>
<b>Figura 5.8</b> – Gráfico de Hammett das constantes de velocidade da decomposição dos compostos <b>18</b> em plasma humano 80 % (v/v) a 37 °C, contra os valores de $\sigma_p$ dos respetivos substituintes. ....	<b>71</b>
<b>Figura 5.9</b> – Cromatogramas a diferentes tempos (0, 7 e 15 minutos) do ensaio cinético com enzima tirosinase do pró-fármaco <b>18a</b> ( $t_{\text{retenção}}$ CN-Amina=2,10 min, $t_{\text{retenção}}$ CN-MMT=2,80 min, $t_{\text{retenção}}$ Intermediário= 5,98 min, $t_{\text{retenção}}$ PF=9,27 min). ....	<b>72</b>
<b>Figura 5.10</b> – Variação das concentrações ( $\mu\text{M}$ ) do pró-fármaco <b>18a</b> , monometiltriazeno (CN-MMT) e respetiva amina (CN-Amina), ao longo do tempo, com enzima tirosinase. ....	<b>73</b>
<b>Figura 5.11</b> – Mecanismo de ativação proposto para a libertação do agente citotóxico (X-MMT) para os pró-fármacos <b>18</b> (X = CN, $\text{COOCH}_3$ , $\text{CONH}_2$ , $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ , $\text{COCH}_3$ , $\text{CH}_3$ ). ....	<b>74</b>
<b>Figura 5.12</b> – Composto obtido após oxidação pelo enzima tirosinase e posterior ciclização do glutaminilhidroxilbenzeno (GHB) [62]. ....	<b>75</b>
<b>Figura 5.13</b> – Regressão não-linear de Michaelis-Menten para determinação do $K_m$ e $V_{\text{max}}$ resultante do ensaio cinético do pró-fármaco <b>18a</b> em presença do enzima tirosinase a 37 °C. ....	<b>76</b>



---

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 2.1</b> – Solventes de eluição e de recristalização para os compostos <b>18a-f</b> , <b>19a-b</b> e <b>20a,b</b> . .....	<b>30</b>
<b>Tabela 2.2</b> – Tempos de retenção e eluentes usados nos ensaios cinéticos com tampão fosfato 0,01 M pH7,4, em plasma humano e na presença do enzima tirosinase a 37 °C dos pró-fármacos <b>18a</b> a <b>18f</b> , <b>19a,b</b> . .....	<b>41</b>
<b>Tabela 2.3</b> – Declives das retas de calibração dos pró-fármacos sintetizados, MMTs e Aminas correspondentes. ....	<b>42</b>
<b>Tabela 3.1</b> – Pró-fármacos <b>18</b> sintetizados. ....	<b>44</b>
<b>Tabela 3.2</b> – Pró-fármacos <b>19</b> sintetizados. ....	<b>44</b>
<b>Tabela 3.3</b> – Pró-fármacos <b>20</b> sintetizados. ....	<b>44</b>
<b>Tabela 3.4</b> – Metodologias usadas para cada pró-fármaco, rendimento (%) e ponto de fusão (p.f.) (°C). ....	<b>50</b>
<b>Tabela 3.5a</b> – Desvios químicos de <sup>1</sup> H-NMR dos pró-fármacos <b>18a-f</b> . ....	<b>52</b>
<b>Tabela 3.5b</b> – Desvios químicos de <sup>1</sup> H-NMR dos pró-fármacos <b>19a,b</b> e <b>20a,b</b> . ....	<b>52</b>
<b>Tabela 4.1</b> – Caracterização físico-química de formulações lipossomais contendo o pró-fármaco <b>18a</b> : influência da composição lipídica. ....	<b>57</b>
<b>Tabela 4.2</b> – Caracterização físico-química de formulações lipossomais contendo o pró-fármaco <b>18d</b> : influência da composição lipídica. ....	<b>58</b>
<b>Tabela 5.1</b> – Valores das constantes de velocidade ( $k_{obs}$ ), respetivos $R^2$ e tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) dos compostos <b>18</b> e <b>19</b> sintetizados e <b>18a</b> e <b>18d</b> incorporados em lipossomas, em tampão fosfato salino (0,01 M pH 7,4) a 37 °C. ....	<b>64</b>
<b>Tabela 5.2</b> – Valores das concentrações de pró-fármaco (PF), X-MMT e X-Amina (%), das constantes de velocidade ( $k_{obs}$ ), respetivos $R^2$ e tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) dos compostos <b>18</b> e <b>19</b> sintetizados e <b>18a</b> e <b>18d</b> incorporados em lipossomas, em plasma humano 80% (v/v), a 37 °C. ....	<b>68</b>
<b>Tabela 5.3</b> – Tempos de meia-vida (h) dos pró-fármacos <b>15b,d</b> , <b>16b</b> em albumina de soro de bovino e <b>17e,g</b> , em plasma humano 80 % (v/v) a 37 °C. Retirado de [33-35]. ....	<b>70</b>
<b>Tabela 5.4</b> – Valores das concentrações de pró-fármaco (PF), X-MMT e X-Amina (%), das constantes de velocidade ( $k_{obs}$ ), respetivos $R^2$ e tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) dos compostos <b>18</b> e <b>19</b> sintetizados e <b>18a</b> e <b>18d</b> incorporados em lipossomas, na presença do enzima tirosinase, a 37 °C. ....	<b>73</b>
<b>Tabela 5.5</b> – Velocidades iniciais de degradação do pró-fármaco <b>18a</b> em presença do enzima tirosinase em função da concentração inicial de pró-fármaco. ....	<b>76</b>

---

**Tabela 5.6** – Valores das constantes catalíticas dos pró-fármacos **17b,f** e dos pró-fármacos **18a,d** sintetizados em presença do enzima tirosinase. ....**77**

**Tabela 5.7** – Valores de logP teóricos e determinados para os pró-fármacos sintetizados. ....**77**

---

## Lista de Abreviaturas, Acrónimos, Siglas e Símbolos

<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>ADEPT</b>	<i>Antibody-Directed Enzyme-Prodrug Therapy</i>
<b>AAI</b>	Amina aromática inactiva
<b>BER</b>	Reparação da excisão de bases
<b>BOC</b>	N-(terc-Butoxicarbonil)
<b>c.c.f.</b>	Cromatografia de camada fina
<b>c.d.o.</b>	Comprimento de onda
<b>CD<sub>3</sub>CN</b>	Acetonitrilo deuterado
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio deuterado
<b>CYP450</b>	Citocromo P450
<b>DCC</b>	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
<b>DEPT</b>	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
<b>DM</b>	<i>Dimyristoyl</i> (dimiristoilo)
<b>DMAP</b>	4-dimetilaminopiridina
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMPC</b>	<i>Dimyristoylphosphocholine</i> (dimiristoil- fosfatidilcolina)
<b>DMPG</b>	<i>Dimyristoylphosphoglycerol</i> (dimiristoil- fosfatidilglicerol)
<b>DMSO</b>	<i>Dimetilsulfoxido</i>
<b>DMTMM</b>	Cloridrato 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
<b>DTIC</b>	5-(3,3-dimetil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida (dacarbazina)
<b>E.I.</b>	Eficácia de Incorporação
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>GC-MS</b>	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> (cromatografia gasosa-espectrometria de massa)
<b>HEPES</b>	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> (tampão de trabalho)
<b>HMT</b>	Hidroximetiltriazeno
<b>HPLC</b>	<i>High-performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta performance)
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IV</b>	Infra-Vermelho

---

<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamento
<b><i>K<sub>m</sub></i></b>	Constante de afinidade – constante de Michaelis-Menten
<b><i>k<sub>obs</sub></i></b>	Constante de velocidade
<b>LC-MS</b>	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i> (cromatografia líquida-espectrometria de massa)
<b>L-DOPA</b>	dihidroxifenilalanina
<b>Lip</b>	Lípido
<b>M</b>	Concentração Molar
<b>MDEPT</b>	<i>Melanocyte-Directed Enzyme Prodrug Therapy</i>
<b>MeOD</b>	Metanol deuterado
<b>MGMT</b>	metil-guanina metil-transferase
<b>MMR</b>	Reparação <i>mismatch</i>
<b>MMT</b>	Monometiltriazeno
<b>n.q.</b>	não quantificado
<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance (Ressonância Magnética Nuclear)
<b>Ø</b>	Diâmetro
<b>p.f.</b>	Ponto de fusão
<b>PC</b>	Phosphocholine (fosfatidilcolina)
<b>PdI</b>	Índice de Polidispersão
<b>PF</b>	Pró-fármaco
<b>PG</b>	Phosphoglycerol (fosfatidilglicerol)
<b>Phe</b>	Grupo fenil do grupo aromático
<b>PI</b>	Polidispersão
<b>ppm</b>	partes-por-milhão
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>t.t.f.</b>	Temperatura de transição de fase
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Tempo de meia-vida
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>TMZ</b>	Temozolomide
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UV-Vis</b>	Ultra-violeta-Vísivel
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidade máxima

---

---

$\delta_c$	Desvio químico de Carbono
$\delta_H$	Desvio químico de próton
$\Omega$	Ohm





# **Capítulo 1**

## **Introdução Geral**

# Introdução Geral

---

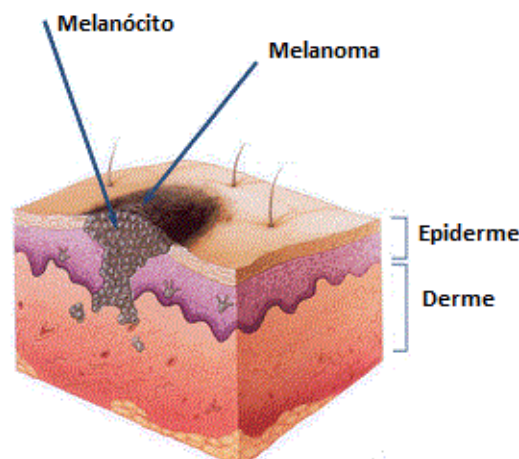
## 1.1 Cancro da Pele

O cancro é caracterizado pela proliferação anormal, rápida e descontrolada das células presentes no nosso organismo. As células cancerígenas têm a capacidade de invadir e destruir tecidos adjacentes, processo designado por metastização.

Um dos tipos de cancro com maior incidência é o cancro da pele que não sendo diagnosticado em fase inicial acaba por ser mortal [1-4]. Sendo a pele o maior órgão do corpo humano que desempenha variadas funções, as células que o constituem assumem também desenvolvimentos diferentes. Por esta razão, existem diferentes tipos de cancro da pele, sendo que os mais diagnosticados são o carcinoma baso-celular, o carcinoma espino-celular e o melanoma maligno [3]. O carcinoma baso-celular é o tipo de cancro da pele mais vulgar e atinge sobretudo pessoas de pele clara que se expõem regularmente ao sol. O seu crescimento é lento e surge habitualmente depois dos 40 anos de idade. O carcinoma espino-celular é o segundo tipo de cancro da pele mais frequente e atinge igualmente os grupos que se expõem ou não ao sol. O seu crescimento é mais rápido e agressivo que o carcinoma baso-celular e surge em grupos de faixa etária mais avançada [3].

## 1.2 Melanoma maligno

O melanoma maligno é considerado o cancro da pele mais perigoso e um dos tumores malignos mais agressivos da espécie humana [3,4,6]. Nos países ocidentais a incidência de melanoma maligno é elevada e tem aumentado cada vez mais [7-9]. O melanoma maligno origina-se a partir dos melanócitos da epiderme (**Figura 1.1**), células responsáveis pela formação da melanina (pigmento natural que dá cor à pele), que alteram a sua fisiologia e se tornam malignos [8].



**Figura 1.1** – Representação ilustrativa do melanoma e das células que lhe dão origem. Adaptado de [9]

O aparecimento deste cancro aumenta preferencialmente com a idade, em pessoas com pele clara (por esta razão a taxa de incidência do melanoma é maior na raça caucasiana do que na raça africana), olhos claros, dificuldade em bronzear, com tendência para formar sardas ou com muitos sinais disseminados pelo corpo. A exposição solar intermitente de radiação ultravioleta (UV), aguda e intempestiva (“escaldões”), são das causas principais deste tipo de cancro da pele [2]. As radiações UV podem induzir cancro por 3 mecanismos: induzindo diretamente danos no DNA e criando mutações no mesmo; produzindo moléculas de oxigénio reativas que por sua vez produzem danos no DNA e noutras estruturas celulares; e induzindo imunossupressão que bloqueia as defesas naturais anticancerígenas do corpo humano [4]. A exposição à radiação UV em combinação com fatores endógenos (como o tipo de pele, perfil imunodeficiente, predisposição genética) faz aumentar ainda mais a incidência de cancro no humano.

Para além de ser necessário fazer mais avisos, campanhas de sensibilização e de prevenção é necessário também que a ida ao médico seja mais precoce e frequente. O diagnóstico e o tratamento têm de ser feitos mais cedo para que o número de mortes devido ao melanoma maligno diminua. Quanto mais cedo as lesões e alguns sinais forem reconhecidos, melhor é o prognóstico apontado para o tratamento do melanoma [3].

A progressão do melanoma está bem definida ao nível clínico, histopatológico e biológico, no entanto os mecanismos moleculares envolvidos e os mecanismos genéticos associados à disseminação e metastização ainda estão por definir [6]. Por esta razão, as abordagens usadas para o tratamento do melanoma maligno podem incidir a diversos níveis.

### **1.3 Tratamento do Melanoma Maligno**

Quando o melanoma maligno é diagnosticado numa fase inicial, este é altamente curável se for removido cirurgicamente e/ou tratado com radio/quimioterapia ou terapia hormonal. No entanto, em fase mais avançada, depois de metastização, torna-se muito difícil de tratar e várias abordagens podem ser testadas [2]. Estas incluem a utilização de fármacos imunomoduladores, anticorpos monoclonais e inibidores de algumas estruturas importantes para o ciclo celular que podem ser implementadas em simultâneo com a quimioterapia [1,6,10]. A atuação de anticancerígenos, que destroem as células do tumor, pode incidir ao nível do crescimento, da sobrevivência celular ou ao nível da angiogénese. Como tal, existem

## Introdução Geral

---

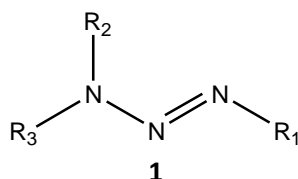
várias classes de anticancerígenos que podem ser usados na terapêutica do melanoma [11], nomeadamente:

- Agentes alquilantes, como mostardas de azoto e triazenos, com ação não específica; podem gerar espécies electrofílicas que se ligam covalentemente a grupos nucleofílicos biologicamente importantes como enzimas, proteínas, RNA e DNA.
- Agentes intercalantes de DNA, que contêm sistemas de anéis aromáticos planos ou sistemas de anéis heteroaromáticos que se intercalam entre cadeias complementares de DNA por ligações fracas reversíveis, impedindo os processos celulares de replicação e transcrição. Exemplo desses agentes são as actinomicinas, bleomicinas e antraciclinas.
- Antimetabolitos, que inibem enzimas envolvidos na síntese do DNA ou que interferem com a formação de um metabolito celular normal, levando à formação de proteínas e ácidos nucleicos anormais. Pertencem a este grupo os análogos de purinas e os inibidores enzimáticos.
- Fármacos que atuam nas proteínas estruturais, bloqueando alguns processos da divisão celular.

Apesar da grande variedade de agentes anti tumorais, estes apresentam ainda algumas falhas ao nível da sua atividade farmacológica: falta de especificidade o que leva a que o fármaco chegue a todas as células de forma indiscriminada; solubilidade em água inadequada que pode comprometer a distribuição do fármaco e expô-lo à ação dos macrófagos; curto tempo de vida como consequência do catabolismo, da ação do sistema reticuloendotelial ou de sistemas de excreção eficazes; carga superficial do fármaco que pode inibir a penetração através da membrana plasmática ou a entrada na célula por difusão passiva; toxicidade sistémica excessiva, que diminui brutalmente a eficácia da terapêutica; e da resistência ao fármaco como consequência de características inatas ou adquiridas [4,12]. Por estas razões, torna-se prioritário a busca contínua de novos anticancerígenos e de novas alternativas para que o tratamento seja mais eficaz.

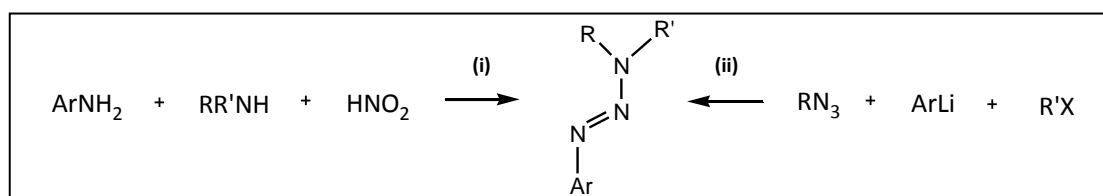
## 1.4 Triazenos

Os triazenos **1**, agentes alquilantes, atualmente são usados no tratamento de melanoma maligno metastático (**Figura 1.2**) [13]. A sua estrutura consiste em três átomos de azoto consecutivos (grupo triazeno). Estes representam o grupo ativo dos triazenos que é responsável pelas suas propriedades químicas, físicas e anti tumorais. Estes compostos podem ser tri-, di-, mono ou não-substituídos, dependendo do número de grupos substituídos (nas posições  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ ).



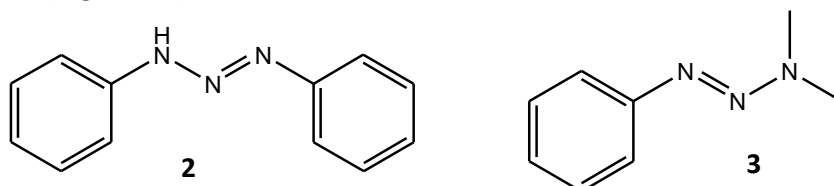
**Figura 1.2** – Estrutura química geral do anti tumoral triazeno **1**.

Triazenos, como **2** e **3**, podem ser facilmente sintetizados a partir de anilinas ou azidas alquílicas (**Figura 1.3**). A partir de anilinas, estas normalmente são tratadas com ião nitrito sob condições ácidas para formar um sal diazónio. Este reage com uma amina primária ou secundária promovendo a formação do composto triazénico. A partir de azidas alquílicas, a reação dá-se com reagentes de Grignard ou lítio alquílicos [14].



**Figura 1.3** – Síntese de triazenos. A partir de anilinas (i) e de azidas alquílicas (ii).

O primeiro triazeno **2** foi sintetizado através do acoplamento de sais de diazónio com outros compostos contendo azoto nucleofílico (**Figura 1.4**) [15]. Clarke *et al.* relataram pela primeira vez a atividade biológica dos triazenos como agentes anti tumorais. O 1-fenil-3,3-dimetiltriazeno **3** (**Figura 1.4**) mostrou inibir o crescimento do sarcoma 180 em ratinhos [16].

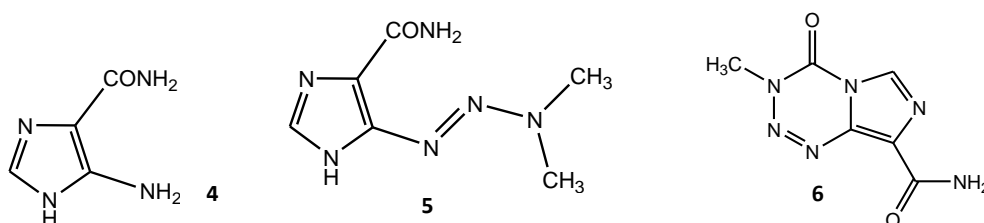


**Figura 1.4** – Estrutura química do primeiro triazeno sintetizado **2** e do triazeno **3** sintetizado por Clarke *et al.*

## Introdução Geral

---

Na tentativa de obter antagonistas do agente alquilante 5-amino-imidazol-4-carboxamida **4**, cujo ribósido é um precursor da biossíntese de purinas foi sintetizado 5-(3,3-dimetil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida **5** (dacarbazina, DTIC) (**Figura 1.5**) [17]. A dacarbazina é um agente quimioterápico aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*), para a monoterapia do melanoma maligno.



**Figura 1.5** – Estrutura de 5-amino-imidazol-4-carboxamida **4**, 5-(3,3-dimetil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida **5** (dacarbazina, DTIC) e temozolomide (TMZ) **6**.

Outro composto sintetizado foi o temozolomide (TMZ) **6** (**Figura 1.5**) [17]. Este fármaco também foi aprovado pelo FDA, mas para tratar astrocitoma anaplásico e o glioblastoma multiforme e outros estudos revelaram que este também mostrava atividade no tratamento do melanoma maligno [18]. O temozolomide em comparação com a dacarbazina mostrou ter melhor biodisponibilidade e melhores propriedades de distribuição [19].

### 1.4.1 Triazenos como Pró-fármacos

A dacarbazina e o temozolomide utilizados em clínica são pró-fármacos (PF), ou seja, são compostos que são derivados químicos farmacologicamente inativos e que requerem uma transformação química ou enzimática de modo a originarem uma molécula ativa [20,21].

Em termos de classificação, os pró-fármacos podem ser divididos de acordo com dois critérios, classificação química e mecanismo de ativação [22]. Pela classificação química, estes podem ser:

- Bioprecursores – compostos que após uma biotransformação (metabolização) originam o fármaco ativo.

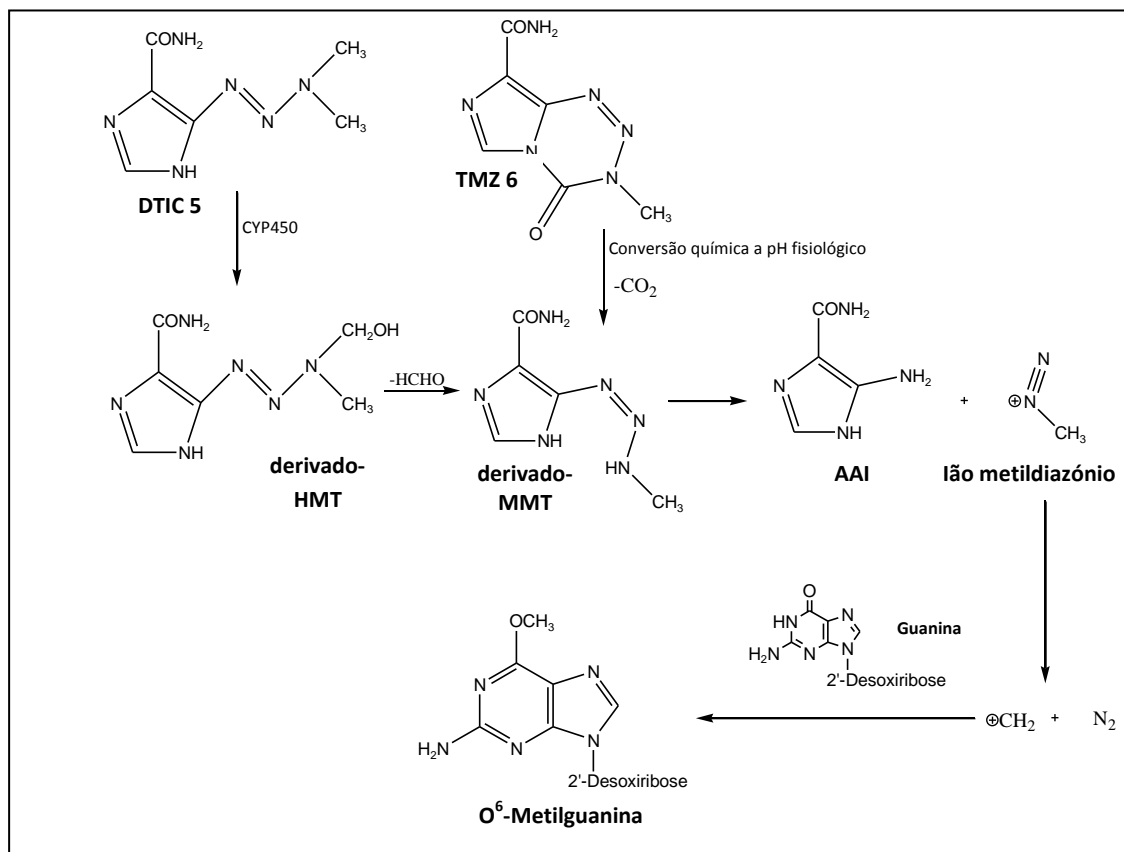
- Pró-fármacos ligados a um transportador – compostos que têm o fármaco ativo ligado a um transportador, que é mais tarde libertado. Dentro deste tipo de pró-fármacos podemos distinguir os pró-fármacos bipartidos em que o grupo funcional do fármaco está ligado diretamente ao transportador e os que apresentam entre o grupo funcional e o transportador/substrato, um braço de ligação (pró-fármacos tripartidos).

Os pró-fármacos também podem ser classificados consoante o mecanismo de ativação:

- Ativados enzimaticamente – pró-fármacos que são ativados por enzimas que estão presentes no sangue (plasma) ou estão sobre-expressos em certos locais. Este tipo de ativação tem como vantagem principal o facto de a libertação do fármaco ativo ser localizada.

- Ativados não-enzimaticamente – pró-fármacos que são ativados por processos químicos (por exemplo: hidrólise química espontânea a pH fisiológico). No entanto, para estes existem alguns problemas ao nível da estabilidade química (tempos de meia-vida curtos) e o local de ativação é indefinido.

Por exemplo, os mecanismos de ativação da dacarbazina e do temozolomide diferem, sendo que no caso da dacarbazina a ativação é enzimática e no caso do temozolomide a ativação é por hidrólise química. Após ativação há formação do ião metildiazónio, que metila as bases guanina do *major groove* do DNA (**Figura 1.6**).



**Figura 1.6** – Mecanismo de ativação da dacarbazina (DTIC) e temozolomida (TMZ) e mecanismo de alquilação do DNA. Adaptado de [17]

A dacarbazina sofre uma N-desmetilação oxidativa, a nível hepático pelo enzima citocromo P450 (CYP450), originando um derivado do hidroximetiltriazeno (derivado-HMT) que por perda do grupo formaldeído, gera um derivado do monometiltriazeno citotóxico (derivado-MMT). O temozolomida é espontaneamente ativado em meio aquoso a pH fisiológico por conversão química gerando também um derivado do monometiltriazeno citotóxico (derivado-MMT) (**Figura 1.6**). Os MMTs, em meio aquoso, sofrem decomposição espontânea, da qual resulta a formação de uma amina aromática inativa (AAI) e o íon metildiazônio. Este, por sua vez, alquila os ácidos nucleicos (DNA e RNA) impossibilitando a célula de se multiplicar. Os triazenos metilam as bases de guanina, predominantemente na posição O<sup>6</sup> e N<sup>7</sup>, do *major groove* do DNA [17].

No entanto, as células humanas conseguem desenvolver mecanismos de defesa e de reparação dos danos causados pelos triazenos, o que leva à resistência aos fármacos. Os três sistemas de reparação de DNA mais conhecidos são: metil-guanina metil-transferase (MGMT), reparação *mismatch* (MMR) e reparação da excisão de bases (BER) [17,23].



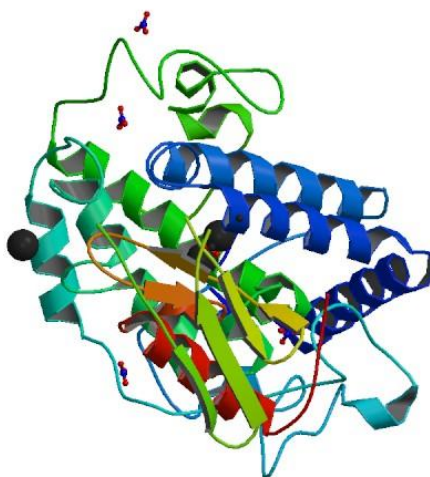
O MGMT remove os aductos alquilo da posição O<sup>6</sup> da guanina do DNA. A níveis elevados de MGMT, este é responsável pela resistência normal e tumoral da célula aos triazenos. Este problema é superado pelo uso de triazenos em presença de inibidores de MGMT, o que aumenta a citotoxicidade contra células-alvo que expressam níveis mais elevados de MGMT [10,17]. O sistema MMR não é capaz de reparar os danos no DNA causados diretamente pelos triazenos, mas repara erros biossintéticos gerados durante a replicação de DNA. O sistema BER é capaz de remover lesões ao nível do metabolismo celular, consegue assim reparar outros tipos de metilação do DNA causados por triazenos. Por existirem estes três mecanismos de reparação do DNA, na terapêutica do melanoma maligno podem ser assim usados inibidores destes sistemas concomitantemente com triazenos [17,24].

# Introdução Geral

---

## 1.5 Tirosinase

O enzima tirosinase (EC 1.14.18.1) (**Figura 1.7**) é um enzima monofenol monooxigenase responsável pela biossíntese da melanina (melanogénese), pigmento fotoprotector [23,24]. Tem um peso molecular de aproximadamente 60-70 kDa nos mamíferos, estando presente também nas plantas, bactérias e fungos [25]. O número de *turnover* do enzima é de  $19000 \text{ min}^{-1}$  (para o substrato dopamina), os valores da constante de afinidade ( $K_m$ ) encontram-se na gama dos milimolar e o tempo de meia-vida do enzima é de 8-10 horas nos melanócitos [2,27]. A tirosinase é sintetizada por ribossomas melanossomais que se encontram no retículo endoplasmático rugoso. Após a sua síntese, a tirosinase é glicosilada, direcionada para o aparelho Golgi e é subsequentemente entregue aos melanossomas [26,27].



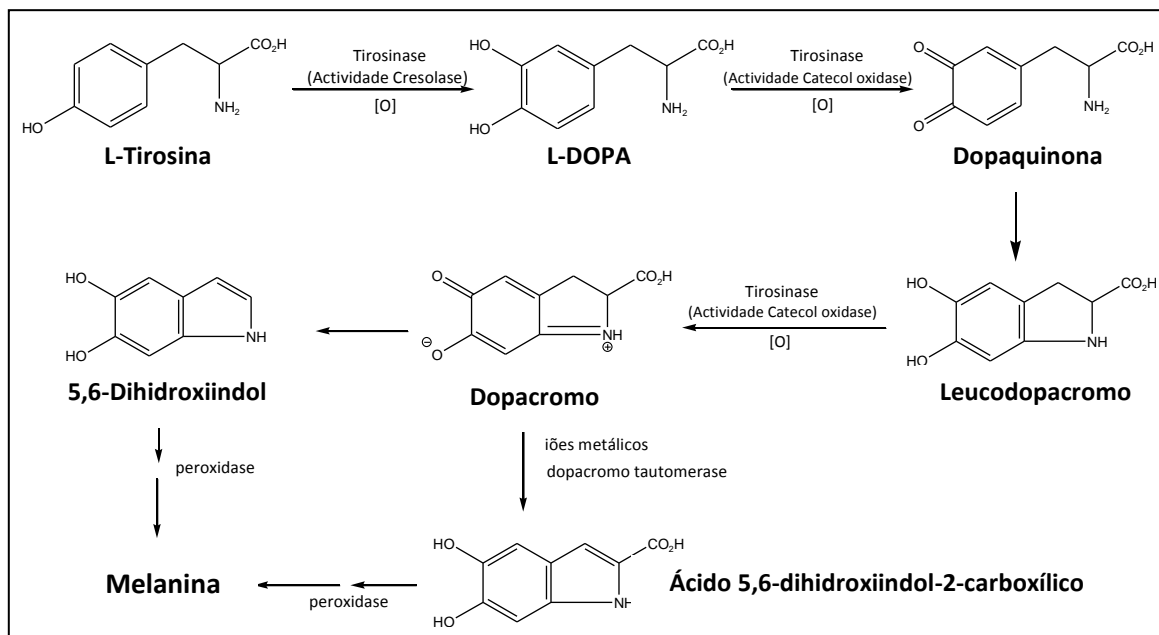
**Figura 1.7** – Estrutura tridimensional do enzima tirosinase (PDB ID. 1WX2). Retirado de [28]

Este enzima oxidoreductase possui um centro ativo com duas atividades catalíticas: monofenolase ou cresolase (EC 1.14.18.1) – hidroxilação de monofenóis a *o*-difenois e difenolase ou catecol oxidase (EC 1.10.3.1) – oxidação de *o*-difenois a *o*-quinonas [2,25,29].

O primeiro passo da melanogénese envolve a oxidação da tirosina pelo enzima tirosinase, convertendo-a em dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (**Figura 1.8**). A atividade catalítica catecol oxidase do enzima, converte L-DOPA em dopaquinona (ortoquinona), que por sua vez, espontaneamente, converte-se em leucodopacromo. Este transforma-se em dopacromo e finalmente em 5,6-dihidroxiindol e ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico. Posteriormente, outros tipos de reações conduzem a várias formas de melanina [2,28].

A tirosinase para além dos seus substratos naturais (monofenóis e *o*-difenois) é capaz de oxidar ainda outros substratos fenólicos e não-fenólicos. Muitos compostos aromáticos *o*-

diaminas e *o*-aminofenóis têm sido descritos como compostos que se transformam em quinonas pela tirosinase e ainda têm sido referidas anilinas que sofrem *o*-hidroxilação pelo enzima [29-31].



**Figura 1.8** – Representação da biossíntese da melanina. Adaptado de [2]

O centro ativo do enzima tirosinase de mamífero, contém um cluster binuclear de cobre que é semelhante ao da tirosinase de cogumelo (*Agaricus bisporus*) [2,30]. Por esta razão o enzima de cogumelo é usado para ensaios cinéticos e de citotoxicidade, pois os resultados são comparáveis com o modelo mamífero [30].

De um modo geral, há duas abordagens quimioterapêuticas no melanoma que envolvem a tirosinase e a libertação do fármaco ativo. Têm sido descritos como *Achilles heel* e *Trojan horse* [4,10].

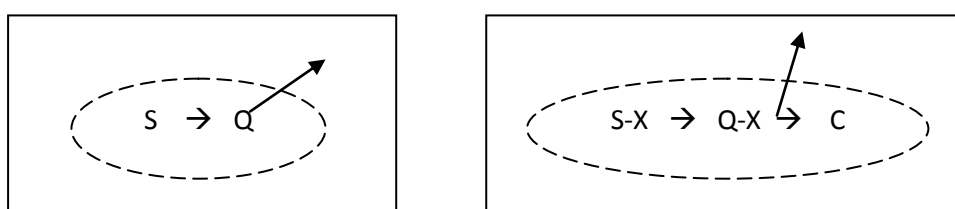
Na abordagem *Achilles heel*, os pró-fármacos contêm substratos análogos aos substratos da tirosinase, que são capazes de maximizar a formação de ortoquinonas reativas por ação da tirosinase. Esta quinona quando é libertada tem a capacidade de se ligar a componentes celulares e causar danos irreversíveis. A maior limitação desta abordagem tem

## Introdução Geral

---

que ver com a necessidade de encontrar níveis de ortoquinona que sejam eficientes para o tratamento do melanoma.

Na abordagem *Trojan horse* são usados pró-fármacos não-tóxicos ativados pelo enzima tirosinase. Estes pró-fármacos são estruturalmente formados por um grupo citotóxico ligado a um substrato com afinidade para a tirosinase. O fármaco citotóxico é libertado posteriormente à oxidação pela tirosinase e é formado um produto de ciclização da ortoquinona. Esta abordagem também é conhecida por MDEPT (*Melanocyte-Directed Enzyme Prodrug Therapy*) (Figura 1.9).



**Figura 1.9** – Esquemas das abordagens *Achilles heel* e *Trojan horse*  
(Legenda: S – substrato; Q – quinona; X – agente citotóxico; C – produto cíclico). Adaptado de [8]

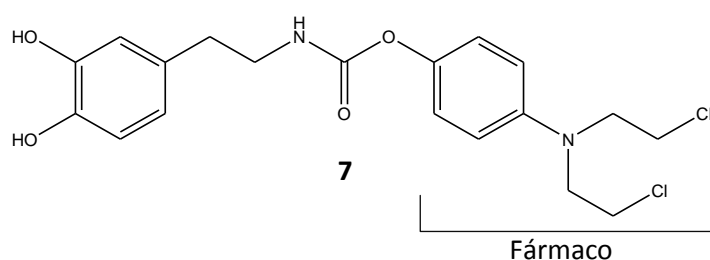
Como o enzima tirosinase se encontra sobre-expresso nos melanócitos malignos, o número de *turnover* é elevado, resultando numa ativação rápida de um pró-fármaco e como a atividade total de tirosinase está relacionado com o nível de malignidade das células, este enzima é considerado um enzima-alvo na terapêutica do melanoma maligno, em especial na aplicação da abordagem MDEPT.

### 1.6 MDEPT

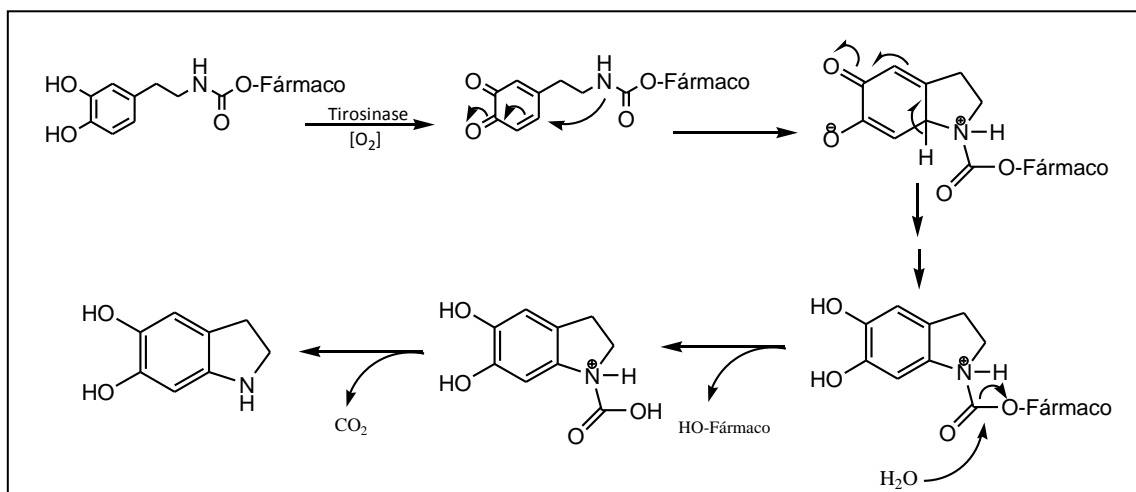
A abordagem terapêutica MDEPT consiste na ativação de um pró-fármaco pelo enzima tirosinase que está sobre-expresso nas células tumorais. Para que esta abordagem seja bem-sucedida alguns requisitos são necessários: o pró-fármaco tem de ter um bom substrato para o enzima expresso no tumor; o pró-fármaco não pode ser ativado por enzimas de tecidos normais e tem de ser capaz de atravessar a membrana celular das células do tumor; a diferença entre a citotoxicidade do pró-fármaco e do fármaco ativo deve ser a mais elevada possível; e o tempo de meia-vida do fármaco ativo deve ser longo o suficiente para induzir morte celular e ao mesmo tempo, adequado para que seja eliminado pela circulação sistêmica [12].

Os mecanismos propostos para a libertação do fármaco ativo através do enzima tirosinase são variados, no entanto, todos apontam para a produção de um intermediário instável, que é hidrolisado dentro das células cancerígenas e que leva à libertação do fármaco citotóxico [33].

Jordan *et al.* foram os primeiros a sugerir um mecanismo de libertação para um pró-fármaco, com uma ligação carbamato (**Figura 1.10**). Este mecanismo apresenta a formação de uma ortoquinona que posteriormente sofre uma ciclização com libertação do fármaco citotóxico (**Figura 1.11**) [33].



**Figura 1.10** – Pró-fármaco **7** sintetizado (Fármaco = mostarda de azoto) por Jordan *et al.* [33]

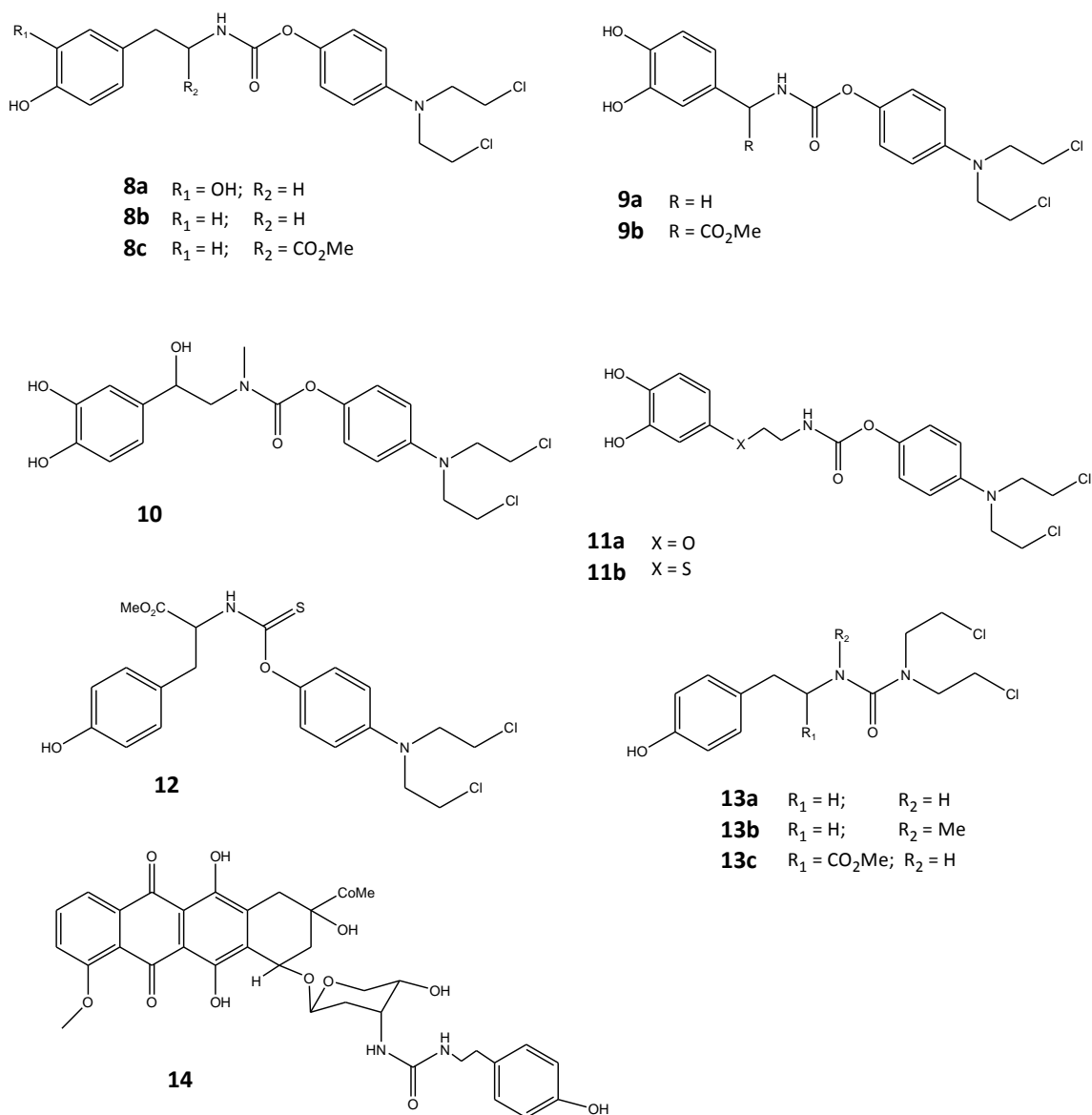


**Figura 1.11** – Mecanismo de liberação do fármaco através do enzima tirosinase, proposto por Jordan *et al.* (Fármaco = mostarda de azoto). Adaptado de [33]

Estudos posteriores do mesmo grupo de autores levaram à síntese de quatro tipos de pró-fármacos [34] (**Figura 1.12**):

- pró-fármacos de mostardas com uma ligação carbamato **8-11**;
- pró-fármaco de mostarda com uma ligação tiocarbamato **12**;
- pró-fármacos de mostardas com uma ligação ureia **13**;
- pró-fármaco contendo o fármaco daunomicina **14**.

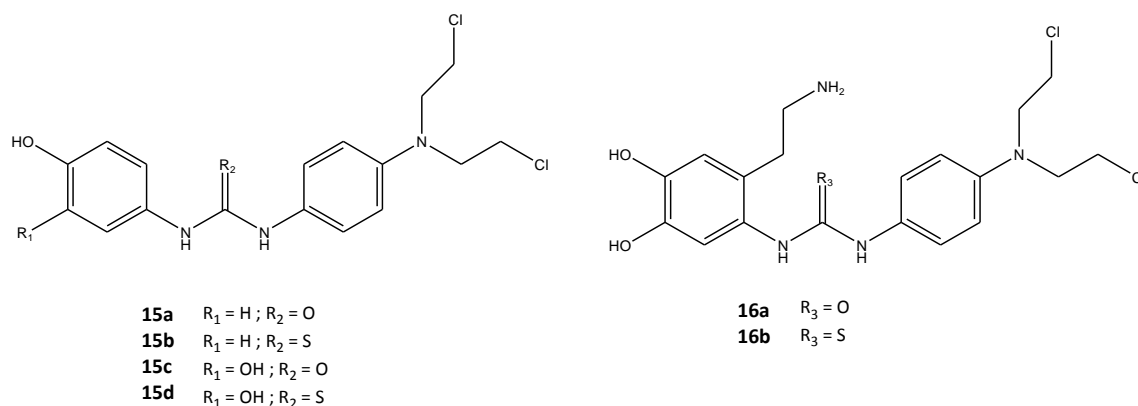
Este estudo permitiu provar que os compostos (**7-9a** e **10-13**) são reconhecidos pelo enzima tirosinase com a consequente liberação do agente citotóxico. O grupo volumoso da daunomicina (**14**) e o grupo  $CO_2Me$  do composto **9b** criaram um grande impedimento estereoquímico na interação entre o centro ativo do enzima e o substrato e por isso estes pró-fármacos revelaram-se maus substratos [34].



**Figura 1.12** – Pró-fármacos **8-14** sintetizados por Jordan *et al.* [34]

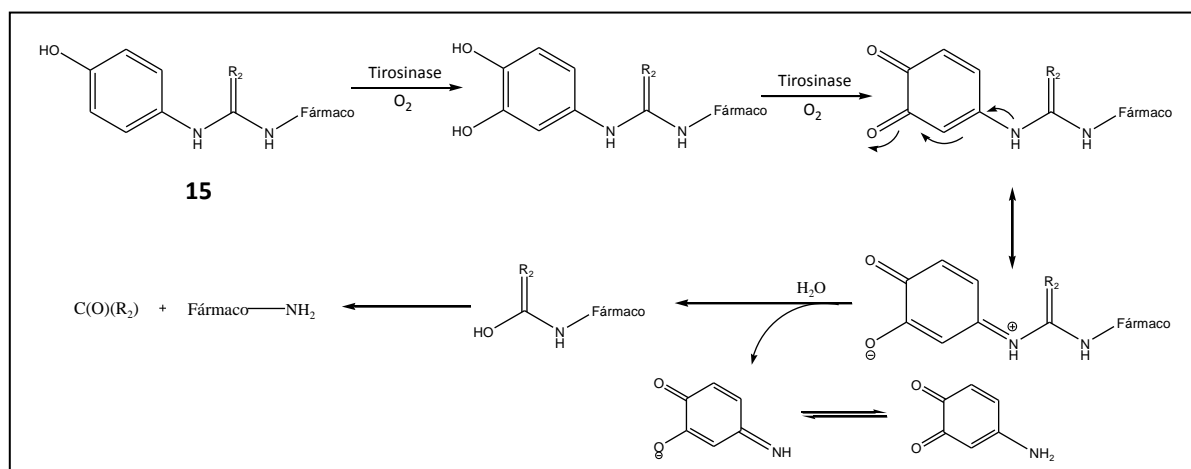
# Introdução Geral

Knaggs *et al.* apresentaram novos pró-fármacos **15** e **16** para aplicação em MDEPT e com o seu trabalho também surgiram mais duas propostas de mecanismos de ativação [35] (**Figura 1.13**).



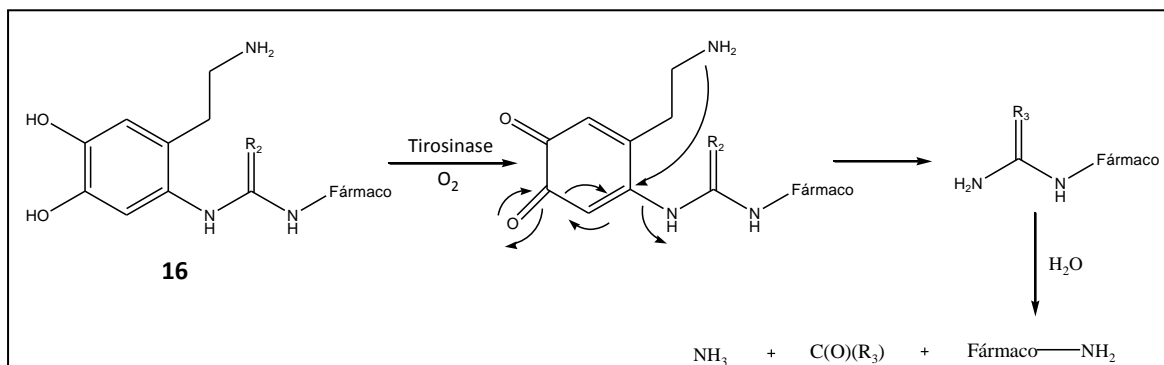
**Figura 1.13** – Pró-fármacos **15** e **16** sintetizados por Knaggs *et al.* Adaptado de [35]

Para os pró-fármacos **15**, foi proposto que na libertação do fármaco, haveria formação de uma ortoquinona, seguida da libertação do fármaco a partir de um intermediário reativo e instável em meio aquoso (**Figura 1.14**) [35]. Para os pró-fármacos **16**, há formação da ortoquinona através da reação de oxidação do enzima tirosinase. A ortoquinona através de um mecanismo intramolecular liberta o fármaco ativo (**Figura 1.15**) [35]. Neste mecanismo, foi observado que os pró-fármacos **16** são oxidados a uma velocidade mais lenta em relação aos pró-fármacos **15**.



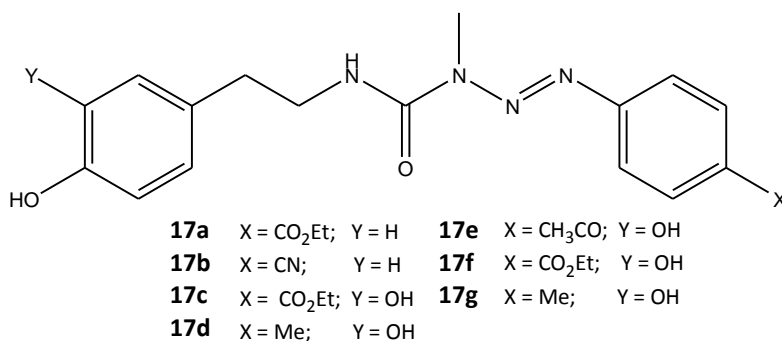
**Figura 1.14** – Mecanismo de libertação do fármaco **15** através do enzima tirosinase, proposto por Knaggs *et al.* (Fármaco = mostarda de azoto). Adaptado de [35]





**Figura 1.15** – Mecanismo de libertação do fármaco **16** através do enzima tirosinase, proposto por Knaggs *et al.* (Fármaco = mostarda de azoto). Adaptado de [35]

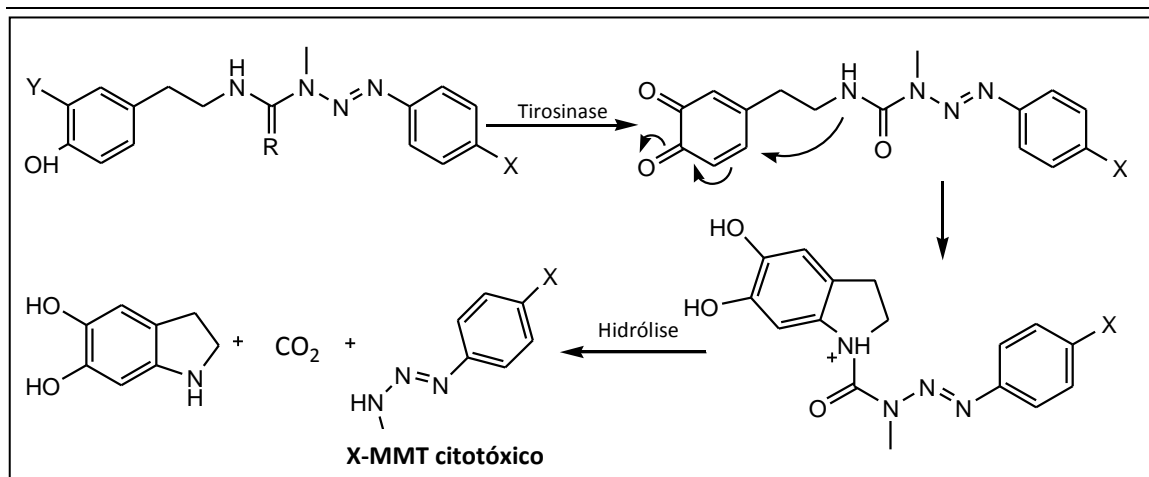
Mais recentemente, Perry *et al.* sintetizaram uma nova série de pró-fármacos **17** para aplicação em MDEPT [36], em que usaram como substrato a dopamina e a tiramina ligados através de uma ligação ureia ao fármaco triazeno (**Figura 1.16**).



**Figura 1.16** – Pró-fármacos sintetizados por Perry *et al.*[36]

Os resultados mostraram que apesar dos pró-fármacos serem reconhecidos pelo enzima tirosinase, observou-se apenas a libertação de um metabolito que não correspondia nem ao agente citotóxico, monometiltriazeno (X-MMT), nem ao seu produto de degradação, amina [37]. O metabolito foi identificado, por LC-MS, como sendo uma *o*-quinona. Estes autores concluíram então que a ciclização proposta na **Figura 1.17** não ocorria, talvez devido ao facto de o azoto (envolvido na ligação ureia) não ser suficientemente nucleofílico neste tipo de estrutura.

## Introdução Geral



**Figura 1.17** – Mecanismo de liberação do fármaco através do enzima tirosinase, proposto por Perry *et al.*. Adaptado de [36]

Apesar das diferenças entre os mecanismos propostos, estes estudos proporcionaram um melhor entendimento sobre a estrutura ideal do pró-fármaco a utilizar na estratégia MDEPT. Foi possível chegar-se às seguintes conclusões [33-36]:

- Os pró-fármacos a usar na metodologia MDEPT devem ser estáveis em plasma humano de modo a libertarem o agente citotóxico apenas no local alvo (melanócitos);
- Os pró-fármacos devem conter bons substratos para o enzima tirosinase e terem efeito citotóxico nas células tumorais;
- Os transportador/substrato devem possuir um anel catecol ou fenol, para permitir a oxidação pela tirosinase e a liberação do fármaco ativo (compostos **7-17**);
- A ligação do fármaco ao transportador pode ser através de uma ponte carbamato (pró-fármacos **7-10**), tiocarbamato (pró-fármacos **11** e **12**), ureia (pró-fármacos **13-17**). Os grupos ésteres junto à ligação tiocarbamato e ureia (como por exemplo nos compostos **12** e **13a**) fazem diminuir a afinidade do pró-fármaco para o enzima.
- A estrutura do transportador influencia estereoquimicamente o reconhecimento do substrato pelo enzima. Os pró-fármacos **9** em relação aos pró-fármacos **13** possuem menos um

átomo de carbono entre o anel aromático e a ligação carbamato e ureia, respetivamente, o que leva a que a afinidade do substrato para o enzima seja diminuída.

- Grupos funcionais do fármaco ativo mais volumosos (como é o caso do pró-fármaco **14**) com grande impedimento estereoquímico, impossibilitam as interações do substrato com o enzima e a sua posterior libertação.

A abordagem MDEPT supera a maior desvantagem de alguns sistemas de transporte de pró-fármacos atuais, em que é necessário administrar um enzima não-humano no local do tumor. É o caso da estratégia ADEPT (*Antibody-Directed Enzyme-Prodrug Therapy*) em que inicialmente tem de se administrar intravenosamente um conjugado de um anticorpo monoclonal com um enzima ativador de fármacos no local alvo [38].

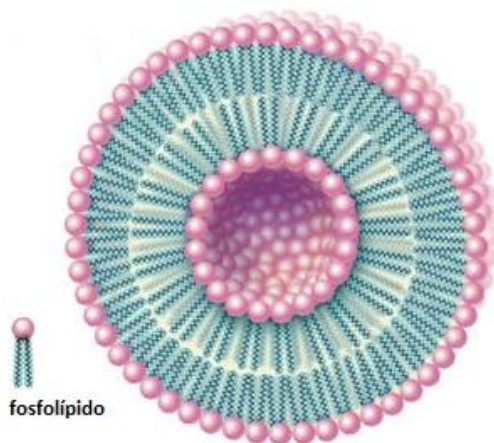
Com a estratégia MDEPT, a seletividade no transporte de agentes citotóxicos pode ser aumentada, os efeitos secundários indesejáveis podem ser diminuídos assim como a necessidade de administrar grandes quantidades de fármaco.

## 1.7 Lipossomas

De forma a ultrapassar algumas limitações dos fármacos, como a sua baixa solubilidade, tempo de meia-vida em circulação e toxicidade nas células surgiram novas tecnologias de formulação. De referir a associação de fármacos a sistemas de veiculação capazes de ultrapassar algumas destas desvantagens apresentadas. De entre os diversos sistemas de veiculação de fármacos destacam-se os lipossomas os quais constituem um dos sistemas mais bem estudados e com maior sucesso, evidenciado pelo número de produtos em fases finais de aprovação ou mesmo já comercializados para utilização em humanos [39].

Os lipossomas são estruturas esféricas, constituídas por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por compartimentos aquosos. Os principais constituintes destes sistemas são fosfolípidos que, em virtude do seu carácter anfipático, uma região polar e outra apolar, na presença de uma solução aquosa, organizam-se de forma a expor para o meio aquoso a parte hidrofílica, enquanto que, a parte hidrofóbica se organiza em bicamada de modo a evitar o meio aquoso [40,41]. Na **Figura 1.18**, encontra-se representada esquematicamente a estrutura de um lipossoma.

A estrutura única deste sistema lipídico permite aos lipossomas a incorporação de moléculas de diferentes propriedades físico-químicas. Assim, as bicamadas lipídicas permitem a incorporação de moléculas hidrofóbicas, enquanto os espaços aquosos asseguram a encapsulação de moléculas hidrofílicas nos seus compartimentos.



**Figura 1.18** – Estrutura de um lipossoma. Adaptado de [42]

A versatilidade estrutural dos lipossomas associada às propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade e semelhança às membranas biológicas permitiu a sua utilização desde 1970 como sistemas de veiculação de fármacos [38,42].

De um modo geral a associação de fármacos a lipossomas apresenta diversas vantagens nomeadamente melhorar a solubilidade de fármacos hidrofóbicos e anfipáticos;

proteger o fármaco da degradação enzimática, promover o aumento da concentração do fármaco nos órgãos-alvo com redução da toxicidade; alterar a farmacocinética e o perfil de biodistribuição do fármaco, comparativamente à respetiva forma livre; permitir a administração por várias vias tais como intravenosa (IV), intramuscular (IM), subcutânea (SC), intraperitoneal (IP), oral, ocular, nasal e dérmica [38,43].

As propriedades das formulações lipossomais podem ser moduladas, em termos de composição lipídica, diâmetro das vesículas, carga elétrica superficial de acordo com as características da molécula a associar bem como do alvo a atingir.

### **1.7.1 Materiais dos lipossomas**

Os lípidos que tipicamente são utilizados na preparação de lipossomas podem ser, ou derivados de dois ácidos gordos esterificados num glicerol (glicerolípidos), ou de um ácido gordo esterificado numa esfingosina (esfingolípidos). A parte hidrófoba do lípido pode estar, por seu lado, esterificada com ácido fosfórico (fosfolípidos) ou com glícidos (glicolípidos), que constituem a parte hidrófila do lípido. Quando os grupos são de carga positiva, como a colina ou etanolamina, dão origem a lípidos zwitteriónicos, como por exemplo a fosfatidilcolina (PC). Quando são neutros como a serina, o inositol ou o glicerol, dão origem a lípidos com carga global negativa, como fosfatidilglicerol (PG) [45]. O grau de insaturação da cadeia acíclica influencia as propriedades físicas da bicamada. O facto de a cadeia ser saturada vai permitir um maior ordenamento das cadeias aciladas dos fosfolípidos e assim, conferindo uma maior rigidez à membrana [40]. Ao contrário, uma bicamada constituída por fosfolípidos com cadeias acíclicas insaturadas resultam num menor ordenamento das mesmas conferindo à membrana uma maior fluidez e menor t.t.f.. As cadeias saturadas mais frequentemente utilizadas são dimiristoilo (DM), dipalmítoilo e diestearoilo.

### **1.7.2 Características dos lipossomas**

As propriedades físico-químicas dos lipossomas estão diretamente relacionadas com a sua composição lipídica e com os métodos de preparação. A composição dos lipossomas pode ser muito variada, através da combinação dos seus constituintes lipídicos. As suas propriedades físico-químicas são influenciadas por diferentes variáveis, nomeadamente: carga dos grupos polares, saturação e comprimento da cadeia acíclica, presença de colesterol,

presença de outras moléculas não lipídicas carregadas, proporção dos vários constituintes (lipídicos ou não). Assim, é possível preparar controladamente versões quase ilimitadas de lipossomas e modular o seu comportamento, o qual está dependente das suas características [46].

### **1.7.3 Preparação de lipossomas**

O método clássico de preparação de lipossomas consiste na dissolução da mistura dos constituintes fosfolipídicos (contendo o agente bioativo no caso de ser hidrófobo) em solvente orgânico compatível, seguido de evaporação em balão de fundo redondo, sob rotação a pressão reduzida ou sob um fluxo de azoto, dando origem à formação de um filme lipídico. A adição, sob agitação, de uma solução aquosa (contendo o agente bioativo no caso de ser hidrófilo) conduz à formação de uma suspensão lipossomal [40].

Para homogeneização do diâmetro dos lipossomas existem várias metodologias. Uma das mais utilizadas consiste na filtração sob pressão (extrusão) por membranas de policarbonato de poros bem definidos.

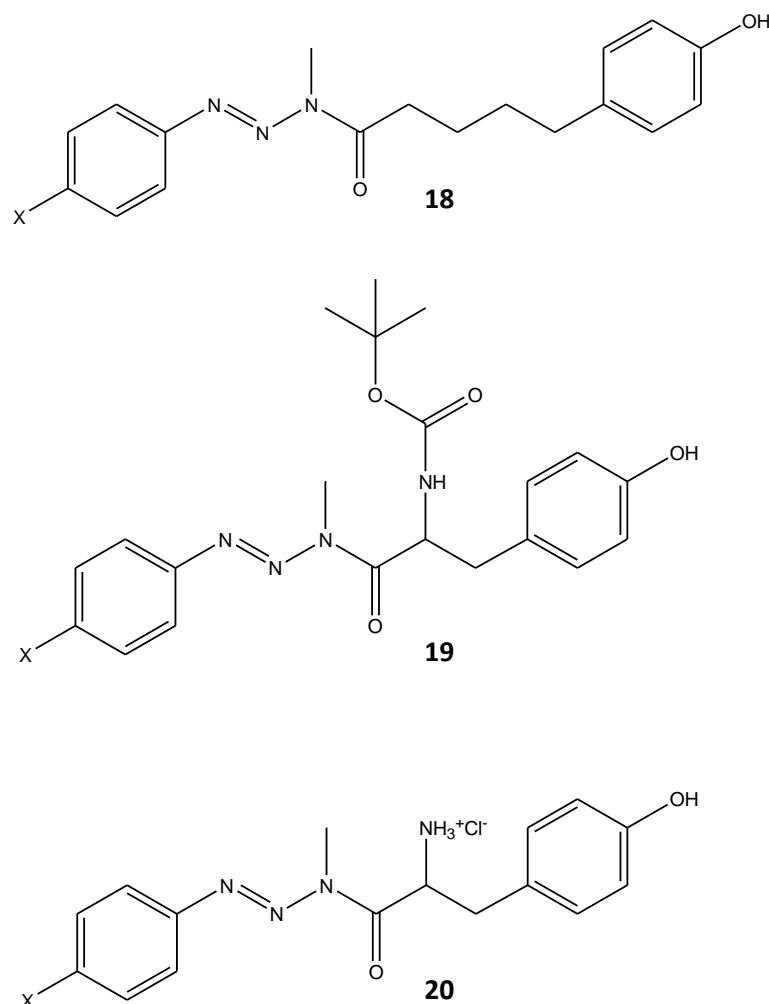
### **1.7.4 Uso de lipossomas em MDEPT**

Os lipossomas, sistemas de veiculação de fármacos, permitem alterar o perfil de biodistribuição das moléculas associadas, evitar os efeitos citotóxicos indesejáveis devido à acumulação dos fármacos nos tecidos ou em órgãos não afetados, promovendo por outro lado, uma acumulação preferencial nos locais afetados. Diferentes moléculas foram associadas em lipossomas para o tratamento do melanoma [47]. Em particular a incorporação de pró-fármacos em lipossomas, aplicados à terapêutica MDEPT, permite ultrapassar algumas limitações destas moléculas quando utilizadas na forma livre, melhorando a sua performance. Recentemente, a avaliação terapêutica de um pró-fármaco após incorporação em lipossomas, num modelo murino de melanoma, resultou numa atividade anti tumoral superior à do respetivo pró-fármaco na forma livre [45]. Esta estratégia combinada representa uma nova abordagem para a terapia do melanoma.

## 1.8 Objetivos do Trabalho

Este trabalho tem como objetivos principais a síntese de pró-fármacos de triazenos para aplicação na estratégia MDEPT e avaliação da sua estabilidade. O trabalho dividiu-se em três partes:

**Síntese de Pró-fármacos** – A estrutura dos pró-fármacos sintetizados **18**, **19** e **20** (Figura 1.19) resultou da ligação de vários substratos possíveis do enzima tirosinase a um fármaco anti tumoral, o monometiltriazeno (MMT), através de uma ligação amida. Os substratos utilizados foram o ácido 5-(4-hidroxifenil)pentanóico, o N-(terc-Butoxicarbonil)-L-tirosina e o cloridrato de tirosina, enquanto que o fármaco ativo usado foi uma série de derivados de MMTs, com atividade citotóxica. Foi escolhida a ligação amida, pois em trabalhos anteriores do grupo a ligação ureia não mostrou a libertação do fármaco ativo.



**Figura 1.19** – Pró-fármacos **18**, **19** e **20** sintetizados (X = CN (**18a**,**19a**,**20a**),  $COOCH_3$  (**18b**,**19b**,**20b**),  $CONH_2$  (**18c**),  $COOCH_2CH_3$  (**18d**),  $COCH_3$  (**18e**),  $CH_3$  (**18f**)).

**Incorporação dos pró-fármacos em lipossomas** – Estudo da influência de diferentes composições lipídicas nos parâmetros de incorporação dos pró-fármacos **18a** e **18d** em lipossomas. Avaliação da influência das formulações desenvolvidas na velocidade de hidrólise dos pró-fármacos em presença de plasma humano, e determinação das suas propriedades como substrato do enzima tirosinase, comparativamente às respectivas formas livres.

**Avaliação da estabilidade dos pró-fármacos sintetizados em tampão fosfato salino (0,01 M pH 7,4), plasma humano 80% (v/v) e em presença do enzima tirosinase** – Os estudos de estabilidade permitiram avaliar o comportamento dos pró-fármacos **18a-f** e **19a,b** antes de entrarem para os melanócitos assim como determinar se os pró-fármacos continham bons substratos para o enzima tirosinase, libertando o agente ativo. Permitiram também entender o efeito estabilizador da incorporação dos pró-fármacos em lipossomas.



## **Capítulo 2**

# **Procedimiento Experimental**

# Procedimento Experimental

---

## 2.1 Equipamentos

- Na cromatografia de camada fina (c.c.f.) usaram-se placas de sílica da Merck DC Kieselgel 60 F254. Foram reveladas usando uma câmara de UV CAMAG, com um comprimento de onda (c.d.o.) de 254nm. Nas cromatografias de coluna utilizou-se sílica gel da Merck Kiesel 60 (0,040-0,063mm).
- Para determinar o c.d.o. máximo de absorção dos pró-fármacos usou-se um espectrofotômetro de UV-Vis Shimadzu UV-160.
- Os espectros de Infra-Vermelho (IV) foram obtidos num espectrofotômetro Shimadzu FTIR spectrometer IRAffinity-1, usando pastilha de brometo de potássio (KBr) (Merck).
- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) ( $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR e  $^{13}\text{C}$ -DEPT-135-NMR) foram traçados num espectrofotômetro Bruker 400 Ultra-Shield. Os desvios químicos ( $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$ ) foram cotados em partes-por-milhão (ppm) relativamente ao tetrametilsilano (TMS) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram cotadas em Hertz (Hz).
- Os pontos de fusão (p.f.) foram determinados numa câmara de Köfler Bock-Monoscop “M”.
- Os estudos de hidrólise dos pró-fármacos de triazenos por HPLC foram realizados num equipamento ELITE LaChrom VWR HITACHI (bomba L-2130; detetor UV L-2400) com um injetor de 20  $\mu\text{L}$  Rheodyne e uma coluna Lichrospher® 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ).
- Nos estudos de hidrólise em plasma humano e em presença do enzima tirosinase usou-se uma centrífuga SIGMA 112 (13000 rpm) e um vortex Genie™, Modelo K-550-GE, Scientific Industries, Inc. Para termostatar as soluções, usou-se um banho Julabo MP com refrigerante Julabo F12 incorporado.
- Para a preparação dos lipossomas foi usado um liofilizador (EDWARDS, Modulyo), um Extruder Lipex Biomembranes, membranas de policarbonato com tamanhos de poros bem definidos (de 1 a 0,2  $\mu\text{m}$ ) (Nucleopore Filtration Products), uma coluna Econo-Pac 10 DG, Bio-RAD (para a filtração gel) e uma ultra centrífuga (rotor tipo 70Ti) (Beckman Instruments).
- Para determinação do diâmetro médio dos lipossomas e do seu potencial zeta utilizaram-se os equipamentos Zeta Sizer, Nano series, Nano-S e Nano-Z, respectivamente (Malvern Instruments).
- Na quantificação de fosfatos dos lipossomas utilizou-se uma unidade de aquecimento de tubos (Lab-Line Multi-Block) e um espectrofotômetro de UV-Vis mini 1240 (Shimadzu).

### 2.2 Reagentes e Solventes

- Na síntese dos vários compostos usaram-se solventes puros ou de grau analítico (p.a.).
- O tetrahidrofurano (THF) da Panreac foi refluxado, antes de cada utilização, na presença de fio de sódio, usando como indicador de humidade a benzofenona (Merck).
- Os reagentes usados nas sínteses dos vários pró-fármacos 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina 97%, trietilamina e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (da Sigma-Aldrich), N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC) (Merck), N-metilmorfolina (Fluka), Hidróxido de Sódio (Riedel-de Haën), N-(terc-Butoxicarbonil)-L-tirosina (BOC-L-Tyr) (novabiochem), nitrometano (Merck) e ácido 5-(4-hidroxifenil)pentanóico (Alfa Aesar) não sofreram qualquer purificação adicional.
- Os derivados monometiltriazenos (MMTs) foram sintetizados pelo grupo de laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia.
- Foram usados vários solventes para os vários passos de purificação dos compostos sintetizados, como: Acetato de Etilo (V. Reis), éter do petróleo (Fisher Chemical), éter etílico (Panreac), metanol, diclorometano e n-hexano (da VWR).
- Os solventes deuterados usados para NMR foram clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) metanol ( $\text{MeOD}$ ) ou acetonitrilo ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) da Merck.
- Na preparação de soluções aquosas usou-se água desionizada obtida através da passagem de água bidestilada numa resina de troca iónica Millipore, sendo recolhida com uma resistividade de 18  $\text{M}\Omega\text{cm}$ .
- Os eluentes usados no HPLC foram Acetonitrilo (ACN) (Scharlau) e água desiozinada ( $\text{H}_2\text{O}$ ).
- Tampão Fosfato Salino (pH 7,4, 0,01 M, a 25 °C) foi preparado dissolvendo uma pastilha do mesmo (Sigma-Aldrich) em 200 mL de água desionizada.
- O enzima tirosinase de cogumelo foi adquirido à Sigma-Aldrich e armazenado em alíquotas de 89  $\mu\text{L}$  (900 U/mL) a -70 °C.
- Para a preparação dos lipossomas foram usados os fosfolípidos: fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) adquiridos à Avanti Polar Lipids.
- Para a quantificação dos fosfatos foi usado: ácido perclórico 70% (Merck), Di-hidrogeno fosfato de sódio, ácido ascórbico (preparação extemporânea) (Panreac) e hexa-molibdato de amónio (Riedel de Haen).
- O tampão de trabalho usado na preparação dos lipossomas foi: HEPES 10 mM (AppliChem) com NaCl 150 mM (Carlo Erba) a pH 7,4, dissolvido em água destilada.

## Procedimento Experimental

---

### 2.3 Síntese dos Pró-Fármacos

#### 2.3.1 Metodologia 1 – Reação com N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC)

##### 2.3.1.1 Metodologia 1a

Para obtenção dos compostos **18a-d** dissolveu-se o ácido 5-(4-hidroxifenil)pentanóico (0,2745g, 1,60 mmol) em tetrahidrofurano (THF) (4,5 mL). Adicionou-se N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,4350g, 2,10 mmol) deixando-se reagir cerca de 2h. À parte, fez-se reagir o monometiltiazeno (X-MMT) (1,68 mmol) com hidreto de sódio (NaH) (0,0672, 1,68 mmol) dissolvidos em THF (3 mL). Posteriormente, adicionou-se a solução de MMT desprotonado à solução do ácido com DCC, juntamente com trietilamina (0,156 mL, 1,12 mmol) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,0137g, 0,112 mmol). A mistura reacional foi seguida por c.c.f. e ficou em agitação à temperatura ambiente durante alguns dias (três a cinco dias). Por fim, o solvente foi evaporado a pressão reduzida (num rota-vapor) e a mistura resultante foi separada por cromatografia em coluna. As frações recolhidas contendo o produto pretendido foram submetidas a várias recristalizações e algumas delas foram submetidas a uma segunda cromatografia em coluna.

Os compostos **19a** e **19b** foram igualmente sintetizados por esta metodologia, mas o substrato usado foi o N-(terc-Butoxicarbonil)-L-tirosina (BOC-L-Tirosina) (0,450g, 1,60 mmol) em substituição do ácido 5-(4-hidroxifenil)pentanóico.

##### 2.3.1.2 Metodologia 1b – Desbloqueamento do grupo BOC

Os compostos **19a** e **19b** depois de purificados foi-lhes removido o grupo ter-butoxicarbonilo. Fez-se borbulhar cloreto de hidrogénio (gasoso) numa solução com os compostos **19a** e **19b** dissolvidos em nitrometano. A reação foi seguida através de c.c.f. e posteriormente, os cloridratos foram evaporados a resíduo seco. Por esta metodologia foram sintetizados os compostos **20a** e **20b**.

### 2.3.2 Metodologia 2 – Reação com N-metilmorfolina/2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (DMTMM)

Para obtenção dos compostos **18e** e **18f** dissolveu-se 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (0,176g, 1 mmol) em THF (2 mL) e adicionou-se N-metilmorfolina (0,33mL, 3mmol). A reação ficou em agitação durante 30-40 minutos a 0-5 °C. De seguida, o ácido 5-(4-hidroxifenil)pentanóico (0,234g, 1 mmol) foi adicionado à mistura reacional e ficou em agitação à temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, foi adicionado o X-MMT (1 mmol) e trietilamina (1 mmol). A mistura reacional foi seguida por c.c.f. e ficou em agitação à temperatura ambiente durante um dia. Por fim, a mistura reacional foi lavada com 2x5 mL de NaHCO<sub>3</sub> (10%) e 3x5 mL de H<sub>2</sub>O. A fase orgânica foi seca com sulfato anidro de sódio e foi evaporado a pressão reduzida (num rota-vapor). A mistura resultante foi separada por cromatografia em coluna. As frações contendo o produto pretendido foram recolhidas e submetidas a várias recristalizações.

Todos os compostos isolados foram caracterizados por técnicas de infravermelho (IV) e de ressonância magnética nuclear - <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR e <sup>13</sup>C-DEPT-135-NMR. Os eluentes usados na cromatografia e os solventes usados na recristalização encontram-se descritos na **Tabela 2.1**.

## Procedimento Experimental

**Tabela 2.1** – Solventes de eluição e de recristalização para os compostos **18a-f**, **19a,b** e **20a,b**.

Composto	Substituinte-X	Solvente de Eluição	Solvente de Recristalização
<b>18a</b>	CN	éter etílico/éter do petróleo (7:3)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH/n-hexano
<b>18b</b>	COOCH <sub>3</sub>	Acetato de Etilo	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH/n-hexano
<b>18c</b>	CONH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH *	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH/n-hexano
<b>18d</b>	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH (9,5:0,5)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH/n-hexano
<b>18e</b>	COCH <sub>3</sub>	Acetato de Etilo/n-hexano (1:1)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /n-hexano
<b>18f</b>	CH <sub>3</sub>	Acetato de Etilo/n-hexano (6:4)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /n-hexano
<b>19a</b>	CN	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH (9,5:0,5)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH/n-hexano
<b>19b</b>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH (9,5:0,5)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH/n-hexano
<b>20a</b>	CN	-	ACN/n-hexano
<b>20b</b>	COOCH <sub>3</sub>	-	ACN/n-hexano

\*separação feita por placa preparativa

## 2.3.3 Caracterização Estrutural dos Pró-fármacos

### 3-[5-(4-hidroxifenil)pentanoil]-1-(4-cianofenil)-3-metiltriazeno (18a)

$^1\text{H NMR}$   $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): **Tabela 3.4a**;  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 175,72 (N-C=O); 153,75 (NN-C<sub>Ar</sub>); 151,79 (HO-C<sub>Phe</sub>); 134,13 (C<sub>Ar</sub>); 133,36 (H-C<sub>Ar</sub>); 129,44 (H-C<sub>Phe</sub>); 122,66 (H-C<sub>Ar</sub>); 118, 57 (C≡N); 115,16 (H-C<sub>Phe</sub>); 112,00 (NC-C<sub>Ar</sub>); 34,75 (CH<sub>2</sub>C<sub>Phe</sub>); 34,16 (OCCH<sub>2</sub>); 31,29 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>Phe</sub>); 28,15 (NCH<sub>3</sub>); 24,49 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>);  $\text{IV } \nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1639 (C=O); 2228 (C≡N); 3418 (O-H).

### 3-[5-(4-hidroxifenil)pentanoil]-1-(4-metoxycarbonilfenil)-3-metiltriazeno (18b)

$^1\text{H NMR}$   $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): **Tabela 3.4a**;  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$  (100MHz, MeOD/ACN): 176,12 (N-C=O); 166,48 (H<sub>3</sub>COC=O); 154,96 (NN-C<sub>Ar</sub>); 152,30 (HO-C<sub>Phe</sub>); 132,83 (H-C<sub>Ar</sub>); 130,38 (C<sub>Ar</sub>); 129,88 (C<sub>Phe</sub>); 128,88 (H-C<sub>Phe</sub>); 121,64 (H-C<sub>Phe</sub>); 114,63 (H-C<sub>Ar</sub>); 34,34-33,69 (CH<sub>2</sub>C<sub>Phe</sub>); 33,36-31,03 (OCCH<sub>2</sub>); 29,29 (NCH<sub>3</sub>); 26,62 (OCH<sub>3</sub>); 25,34-24,66 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>Phe</sub>); 24,31-22,82 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>);  $\text{IV } \nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1611 (C=O); 1713 (C=O); 2928 (C-H); 2851 (C-H); 3327 (O-H).

### 3-[5-(4-hidroxifenil)pentanoil]-1-(4-aminocarbonilfenil)-3-metiltriazeno (18c)

$^1\text{H NMR}$   $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): **Tabela 3.4a**;  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$  (100MHz, MeOD): 176,14 (N-C=O); 170,09 (H<sub>2</sub>NC=O); 154,94 (NN-C<sub>Ar</sub>); 151,33 (HO-C<sub>Phe</sub>); 133,68 (C<sub>Ar</sub>); 132,84 (C<sub>Phe</sub>); 128,89 (H-C<sub>Phe</sub>); 128,54 (H-C<sub>Ar</sub>); 121,59 (H-C<sub>Phe</sub>); 114,65 (H-C<sub>Ar</sub>); 34,32 (CH<sub>2</sub>C<sub>Phe</sub>); 33,73 (OCCH<sub>2</sub>); 31,06 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>Phe</sub>); 29,30 (NCH<sub>3</sub>); 24,36-22,82 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>);  $\text{IV } \nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1645 (C=O); 1659 (C=O); 3372 (O-H).

### 3-[5-(4-hidroxifenil)pentanoil]-1-(4-etoxycarbonilfenil)-3-metiltriazeno (18d)

$^1\text{H NMR}$   $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): **Tabela 3.4a**;  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$  (100MHz, ACN): 176,54 (N-C=O); 166,63 (H<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COC=O); 155,76 (NN-C<sub>Ar</sub>); 153,20 (HO-C<sub>Phe</sub>); 134,34 (C<sub>Ar</sub>); 131,41 (C<sub>Ar</sub>); 131,27-130,21 (H-C<sub>Ar</sub>); 122,76 (H-C<sub>Phe</sub>); 118,26 (C<sub>Phe</sub>); 115,83 (C<sub>Phe</sub>); 115,74 (H-C<sub>Phe</sub>); 61,96 (H<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COC); 35,16 (CH<sub>2</sub>C<sub>Phe</sub>); 34,61 (OCCH<sub>2</sub>); 32,00 (NCH<sub>3</sub>); 30,80 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>Phe</sub>); 25,21 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 14,47 (OC-H<sub>3</sub>);  $\text{IV } \nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1641 (C=O); 1738 (C=O); 3404 (O-H).

### 3-[5-(4-hidroxifenil)pentanoil]-1-(4-acetilfenil)-3-metiltriazeno (18e)

$^1\text{H NMR}$   $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): **Tabela 3.4a**;  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 197,88 (C<sub>Ar</sub>-C=O); 176,11 (N-C=O); 154,10 (HO-C<sub>Phe</sub>); 152,25 (NN-C<sub>Ar</sub>); 136,88 (O=C-C<sub>Ar</sub>); 134,02 (H<sub>2</sub>C-C<sub>Phe</sub>); 129,73 (H-C<sub>Phe</sub>); 129,53 (H-C<sub>Ar</sub>); 122,21 (H-C<sub>Ar</sub>); 115,30 (H-C<sub>Phe</sub>); 34,82 (CH<sub>2</sub>C<sub>Phe</sub>); 34,39 (OCCH<sub>2</sub>); 31,43 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>Phe</sub>); 28,06 (NCH<sub>3</sub>); 26,87 (H<sub>3</sub>COC<sub>Ar</sub>); 21,43 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>);  $\text{IV } \nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1697 (C=O); 1748 (C=O); 3300 (O-H).

### 3-[5-(4-hidroxifenil)pentanoil]-1-(4-tolil)-3-metiltriazeno (18f)

$^1\text{H NMR}$   $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): **Tabela 3.4a**;  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 176,08 (N-C=O); 153,91 (HO-C<sub>Phe</sub>); 146,79 (NN-C<sub>Ar</sub>); 139,35 (H<sub>3</sub>C-C<sub>Ar</sub>); 134,33 (H<sub>2</sub>C-C<sub>Phe</sub>); 129,93 (H-C<sub>Phe</sub>); 129,54 (H-C<sub>Ar</sub>); 122,01 (H-C<sub>Ar</sub>); 115,26 (H-C<sub>Phe</sub>); 34,91 (CH<sub>2</sub>C<sub>Phe</sub>); 34,29 (OCCH<sub>2</sub>); 31,52 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>Phe</sub>); 31,10 (NCH<sub>3</sub>); 27,73 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 21,43 (H<sub>3</sub>CC<sub>Ar</sub>);  $\text{IV } \nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1675 (C=O); 3390 (O-H).

### 3-[2-(N-BOC-amino)-3-(4-hidroxifenil)]-1-(4-cianofenil)-3-metiltriazeno (19a)

$^1\text{H NMR}$   $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): **Tabela 3.4b**;  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 133,27 (H-C<sub>Ar</sub>); 130,32 (H-C<sub>Phe</sub>); 122,96 (H-C<sub>Ar</sub>); 115,30 (H-C<sub>Phe</sub>); 53,27 (OCC-HNH); 39,17 (HNCHC-H<sub>2</sub>); 28,38-28,33 (OC(C-H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);  $\text{IV } \nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1680 (C=O); 1703 (C=OO); 2228 (C≡N); 3350 (O-H).

### 3-[2-(N-BOC-amino)-3-(4-hidroxifenil)]-1-(4-metoxycarbonilfenil)-3-metiltriazeno (19b)

$^1\text{H NMR}$   $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): **Tabela 3.4b**;  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 174,70 (NC=O); 166,55 (H<sub>3</sub>COC=O); 155,34 (HNC=O); 155,20 (NN-C<sub>Ar</sub>); 151,57 (HO-C<sub>Phe</sub>); 130,69 (C<sub>Ar</sub>); 130,47-130,28 (H-C<sub>Ar</sub>); 127,50 (C<sub>Phe</sub>); 122,24-115,40 (H-C<sub>Phe</sub>); 53,42 (HNC-H); 52,38 (OC-H<sub>3</sub>); 39,00 (CH<sub>2</sub>C<sub>Phe</sub>); 33,31 (NCH<sub>3</sub>); 28,34-28,19 (OC(C-H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);  $\text{IV } \nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1680 (C=O); 1707 (C=O); 1708 (C=OO); 3264 (O-H).

### 3-[2-amino)-3-(4-hidroxifenil)propanoil]-1-(4-cianofenil)-3-metiltriazeno (20a)

$^1\text{H NMR}$   $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): **Tabela 3.4b**;  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$  (100MHz, MeOD): 172,90 (NC=O); 158,23 (NN-C<sub>Ar</sub>); 152,39 (HO-C<sub>Phe</sub>); 134,52 (H-C<sub>Ar</sub>); 131,32 (H-C<sub>Phe</sub>); 125,77 (C<sub>Ar</sub>); 124,28 (C<sub>Phe</sub>); 119,28 (C≡N); 116,60 (H-C<sub>Phe</sub>); 113,93 (NC-C<sub>Ar</sub>); 54,45 (HNC-H); 38,25 (NCH<sub>3</sub>); 28,61 (CH<sub>2</sub>C<sub>Phe</sub>);  $\text{IV } \nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1672 (C=O); 1715 (C=O); 2241 (C≡N); 3383 (O-H).

### 3-[2-amino)-3-(4-hidroxifenil)propanoil]-1-(4-metoxycarbonilfenil)-3-metiltriazeno (20b)

$^1\text{H NMR}$   $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): **Tabela 3.4b**;  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$  (100MHz, MeOD): 172,77 (NC=O); 167,72 (H<sub>3</sub>COC=O); 159,88 (NN-C<sub>Ar</sub>); 158,31 (C<sub>Ar</sub>); 152,79 (C<sub>Phe</sub>); 132,15 (H-C<sub>Ar</sub>); 131,70 (H-C<sub>Phe</sub>); 131,44 (C<sub>Ar</sub>); 125,72 (C<sub>Phe</sub>); 123,47 (H-C<sub>Ar</sub>); 116,67 (H-C<sub>Phe</sub>); 54,51-52,88 (OC-H<sub>3</sub>); 38,14-34,17 (HNC-H); 28,48 (CH<sub>2</sub>C<sub>Phe</sub>); 26,76-26,08 (NCH<sub>3</sub>);  $\text{IV } \nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : impossível de realizar por falta de composto.



### 2.4 Influência da incorporação de pró-fármacos em lipossomas

#### 2.4.1 Preparação de Lipossomas

Os pró-fármacos foram incorporados em formulações distintas preparadas com as seguintes composições lipídicas: – fosfatidilcolina (PC), – mistura de PC com fosfatidilglicerol (PG) (7:3), – dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e – mistura de DMPC com dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) (7:3), incorporando os pró-fármacos **18a** e **18d**.

Cada formulação foi preparada do seguinte modo: os respectivos fosfolípidos e o pró-fármaco foram pesados e solubilizados em clorofórmio, numa razão molar de 30,0:1,0. O solvente foi evaporado num rota-vapor até obtenção de um filme lipídico. Este filme lipídico foi hidratado com água destilada. A suspensão lipossomal foi congelada e liofilizada durante a noite. O pó liofilizado assim formado foi reidratado com tampão de trabalho (HEPES 10 mM com NaCl 150 mM, pH 7,4) – 20% do volume total e passados 30 minutos com os restantes 80% do volume total, a uma temperatura superior à temperatura de transição dos fosfolípidos utilizados. A suspensão foi extrusada sequencialmente sob pressão utilizando membranas de polycarbonato de diferentes porosidades (de 1 a 0,2  $\mu\text{m}$ ). O pró-fármaco não-incorporado foi separado por filtração gel numa coluna Econo-PAC 10DG. A fração lipossomal foi então submetida a um passo de ultracentrifugação (250,000 g durante 2 horas a 15 °C) – para concentração e o *pellet* foi ressuspendido no volume respetivo.

Ao longo da preparação dos lipossomas foram retiradas algumas amostras que serviram para caracterizar a formulação durante as várias fases do processo (uma amostra inicial após hidratação dos liofilizados e uma amostra final após centrifugação dos lipossomas). Foram determinados os parâmetros de incorporação, quantificando a concentração lipídica, por espectrofotometria (método de Rouser) e do pró-fármaco (por HPLC) presentes em cada formulação. Foram ainda determinados o diâmetro médio e o potencial-zeta dos lipossomas.

## Procedimento Experimental

---

### 2.4.2 Quantificação de fosfolípidos – Método de Rouser

O método de quantificação dos fosfolípidos foi baseado na determinação colorimétrica de fosfato inorgânico ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) presente nas suspensões lipossomais. O fosfato inorgânico é convertido a ácido fosfomolibdico, que é quantitativamente convertido a um complexo azul devido à redução do ácido ascórbico após aquecimento, tal como descrito por Rouser [48].

Inicialmente, prepararam-se tubos com concentrações crescentes de uma solução-mãe de fosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,5 mM) de forma a traçar uma reta de calibração (de 0,02 a 0,08  $\mu\text{mol}$ ) (em **Anexo, Figura A.7**). Foram também adicionados a tubos volumes das formulações lipossomais previamente diluídas, no intervalo de concentrações da reta de calibração. Todos os tubos foram colocados numa placa de aquecimento até à secura total. Adicionaram-se 0,3 mL de ácido perclórico a 70% e de seguida os tubos foram aquecidos a 180 °C durante 45 minutos. Durante este passo ocorre a hidrólise dos fosfolípidos e formação do fosfato inorgânico que irá ser doseado. Após arrefecimento dos tubos à temperatura ambiente, adicionaram-se 1 mL de água destilada, 0,4 mL de hexa-molibdato de amónio 1,25% (p/v), 0,4 mL de ácido ascórbico a 5% (p/v) (preparado extemporaneamente) seguida de agitação. Colocaram-se os tubos num banho a 100 °C durante 5 minutos, para formação do complexo azul e depois de arrefecidos foram lidas as absorvências a 797 nm contra um branco de referência. Todos os doseamentos foram efetuados em triplicado.

A quantidade de fosfato na amostra foi obtida através da reta de calibração com o auxílio de uma regressão linear.

### 2.4.3 Quantificação do pró-fármaco

A quantificação do pró-fármaco incorporado nos lipossomas foi realizada por HPLC, após diluição da amostra em acetonitrilo e injeção no sistema. Registou-se o valor da área do pico correspondente ao pró-fármaco. Através de uma reta de calibração (Cap. 2.5.4) com o auxílio de uma regressão linear determinou-se o valor da concentração de pró-fármaco de cada formulação lipossomal. As condições usadas no HPLC para cada pró-fármaco estão as descritas na **Tabela 2.2**.

### 2.4.4 Caracterização físico-química das formulações lipossomais

As formulações lipossomais foram caracterizadas em função da composição lipídica selecionada. Os parâmetros de incorporação utilizados para a caracterização das formulações lipossomais foram:

- Razão inicial de pró-fármaco/lípido (nmol/ $\mu$ mol)
- Razão final de pró-fármaco/lípido (nmol/ $\mu$ mol)
- Eficácia de Incorporação (%)
- Tamanho médio dos lipossomas –  $\phi$  ( $\mu$ m)
- Índice de polidispersão – Pdl
- Carga superficial da formulação lipídica – Potencial Zeta (mV)

#### 2.4.4.1 Razões de pró-fármaco/lípido

As razões iniciais e finais de pró-fármaco/lípido foram calculadas (**Equação 2.1**), a partir das concentrações obtidas na quantificação de pró-fármaco e lípido (descrito anteriormente).

$$\text{Razão pró-fármaco/lípido} = \frac{[PF]}{[lípido]} \text{ (Equação 2.1)}$$

#### 2.4.4.2 Eficácia de Incorporação

A eficácia de incorporação (E.I.) foi calculada através da **Equação 2.2**.

$$E. I. = \frac{\left(\frac{[PF]}{[Lip]}\right)^f}{\left(\frac{[PF]}{[Lip]}\right)^i} * 100 \text{ (Equação 2.2)}$$

Através da E.I. foi possível avaliar a capacidade de incorporação dos pró-fármacos em função das condições iniciais utilizadas na preparação dos lipossomas.

## Procedimento Experimental

---

### 2.4.4.3 Determinação do tamanho médio

O diâmetro dos lipossomas foi determinado por Espectrofotometria de Correlação Fotônica no aparelho Zeta Sizer, Nano series, Nano-S. Esta técnica monitoriza a difração da luz provocada pelos movimentos brownianos das partículas em suspensão. Como medida da homogeneidade e da suspensão lipossomal, o sistema reporta um índice de polidispersão (Pdl), que varia entre 0 para uma amostra totalmente monodispersa e o valor de 1 para uma suspensão polidispersa.

Para determinar o diâmetro médio (diâmetro em nm) e o índice de polidispersão, as amostras foram previamente diluídas em meio aquoso (tampão de trabalho) para uma concentração lipídica final de 0,3  $\mu\text{mol/mL}$  e adicionadas numa célula apropriada. Os valores obtidos forneceram uma informação acerca do diâmetro e homogeneidade das suspensões lipossomais, permitindo controlar as variações ao longo das várias etapas da preparação dos lipossomas.

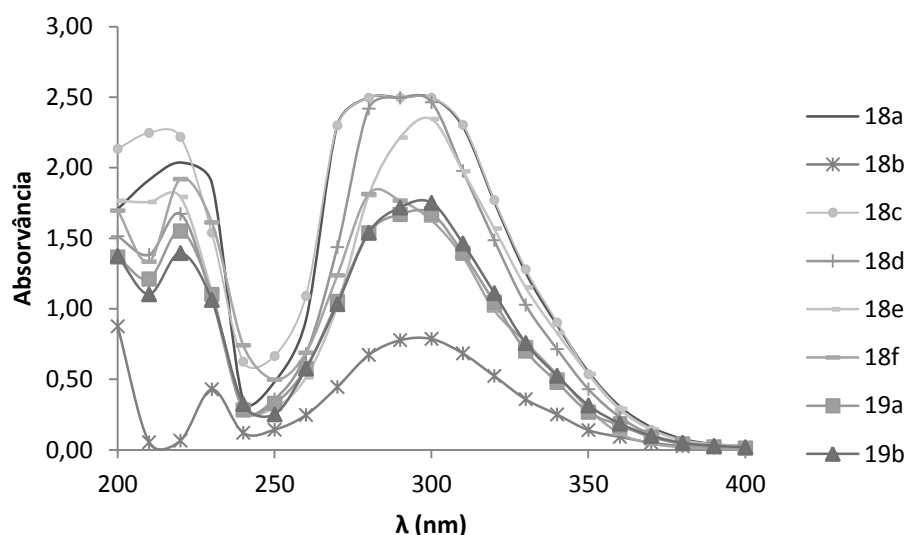
### 2.4.4.4 Determinação do potencial-zeta dos lipossomas

A determinação da carga elétrica superficial dos lipossomas foi efetuada através da obtenção do potencial zeta. O potencial zeta mede a velocidade de deslocação das partículas em suspensão quando submetidas a um campo elétrico. As amostras foram diluídas no Tampão de trabalho para uma concentração lipídica final de 0,3  $\mu\text{mol/mL}$ . As amostras foram introduzidas numa célula descartável com a ajuda de uma seringa para evitar a formação de bolhas. Os resultados obtidos forneceram informação sobre a carga superficial dos lipossomas, potencial-zeta, em mV.

### 2.5 Avaliação dos compostos como pró-fármacos de triazenos

#### 2.5.1 Determinação do comprimento de onda máximo de absorção dos pró-fármacos

Numa célula de quartzo contendo 3 mL de acetonitrilo juntou-se 30  $\mu\text{L}$  de solução de pró-fármaco (de concentração  $10^{-2}$  M). Num espectrofotómetro de UV, foram traçados espectros de absorção no intervalo de 200 e 400 nm de c.d.o.



**Figura 2.1** – Espectros de Absorção dos pró-fármacos **18a-f** e **19a,b** entre 200 e 400 nm.

Os compostos apresentaram máximos de absorção entre 284 e os 307 nm (**Figura 2.1**) (valores apresentados no Cap. 2.3.3) e foi escolhido o c.d.o. de 300 nm para os estudos de HPLC.

#### 2.5.2 Estudos Cinéticos em Tampão Fosfato Salino

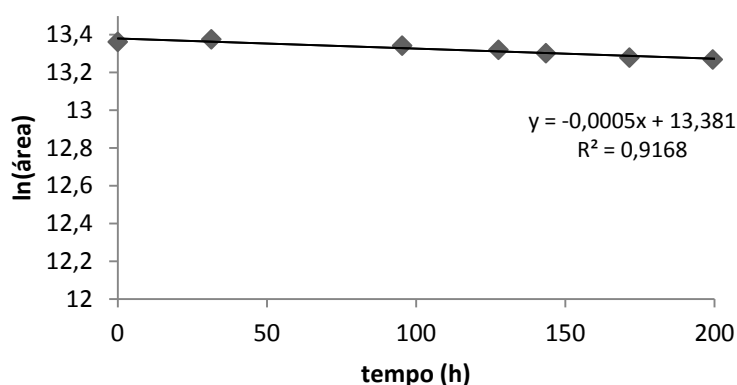
Os estudos cinéticos por HPLC foram feitos inicialmente em tampão fosfato salino (0,01 M, pH 7,4). Adicionou-se 10 mL de tampão fosfato salino (0,01 M a pH 7,4) num *erlenmeyer* e colocou-se num banho previamente termostatado a 37 °C. Posteriormente, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de solução de pró-fármaco (de concentração  $10^{-2}$  M em acetonitrilo). Ao longo do tempo retirou-se alíquotas que foram analisadas por HPLC, a um comprimento de onda determinado anteriormente (300 nm), num fluxo de 1,00 mL/min e nas condições apresentadas na **Tabela 2.2**.

## Procedimento Experimental

---

Os ensaios seguiram cinéticas de pseudo-1ª ordem e foram seguidas até pelo menos 3 meias-vida. Foram calculados os valores das constantes de velocidade ( $k_{obs}$ ), obtidos a partir do declive dos gráficos do logaritmo neperiano da área do pico do pró-fármaco em função do tempo (**Figura 2.2**) (**Equação 2.3**).

$$\ln(\text{área}) = -k_{obs} * t \text{ (Equação 2.3)}$$



**Figura 2.2** – Variação do  $\ln(\text{área})$  ao longo do tempo no ensaio cinético em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4 a 37 °C do pró-fármaco **18a**.

Os respetivos tempos de meia-vida, isto é, o tempo necessário para que a concentração (área) se reduza a metade, foram calculados a partir da equação (**Equação 2.4**).

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{obs}} \text{ (Equação 2.4)}$$

A identificação dos produtos ao longo dos estudos cinéticos foi feita por comparação com os tempos de retenção dos padrões (X-MMT e X-Amina) correspondentes a cada um dos compostos sintetizados (**Figura A.8** em **Anexo**).

### 2.5.3 Estudos Cinéticos em Plasma Humano

O plasma humano utilizado nestes estudos foi obtido a partir de sangue de indivíduos saudáveis e foi recolhido em tubos com heparinato de sódio. Depois de centrifugado, todo o plasma sobrenadante foi dividido por vários frascos de vidro em frações de 2 mL, que foram conservados a -70 °C. Antes de cada utilização procedeu-se ao descongelamento gradual do plasma, de forma a evitar a desnaturação das proteínas plasmáticas.

Para o ensaio cinético, uma mistura de plasma humano (2 mL) com tampão fosfato salino (0,01 M pH 7,4) (0,5 mL) foi termostatizado num banho a 37 °C. Adicionou-se 12,5 µL de solução do pró-fármaco sintetizado (a uma concentração de  $10^{-2}$  M). Várias alíquotas (200 µL) da mistura reacional foram recolhidas ao longo do tempo para *eppendorfs* contendo 400 µL de acetonitrilo para desproteinização. Em seguida, foram centrifugados a 13000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi injetado em duplicado e analisado por HPLC, a um comprimento de onda 300 nm, num fluxo de 1,00 mL/min e nas condições apresentadas na **Tabela 2.2**. Os ensaios foram feitos em triplicado.

### 2.5.4 Estudos Cinéticos com Enzima Tirosinase

Num frasco colocou-se 2,34 mL de tampão fosfato salino (0,01 M pH 7,4), 0,6 mL de dimetilsulfoxido (DMSO), 300 Unidades de enzima (29 µL de uma solução de enzima tirosinase, correspondente a 100 U/mL) num banho termostatado a 37 °C. De seguida, adicionou-se 15 µL de solução do pró-fármaco sintetizado (a uma concentração de  $10^{-2}$  M). Várias alíquotas (200 µL) da mistura reacional foram recolhidas durante uma hora para *eppendorfs* contendo 400 µL de acetonitrilo. Em seguida, foram centrifugados a 13000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi injetado em duplicado e analisado por HPLC, a um comprimento de onda 300 nm, num fluxo de 1,00 mL/min e nas condições apresentadas na **Tabela 2.2**.

#### 2.5.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos para os pró-fármacos

Posteriormente, de forma a determinar os parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) do enzima para os pró-fármacos testaram-se diferentes concentrações de pró-fármaco (0 a 10 mM) frente ao enzima tirosinase, cuja concentração manteve se constante em todos os ensaios. Num frasco, colocou-se 0,3 mL de DMSO, 15 Unidades de enzima e um determinado volume de tampão fosfato salino (0,01 M pH 7,4) e de pró-fármaco de forma a obter a concentração

## Procedimento Experimental

---

final pretendida, num volume final de 3 mL. O ensaio realizou-se a 37 °C e durante duas horas foram retirados a diferentes tempos alíquotas (200 µL) da mistura reacional para *eppendorfs* contendo 200 µL de acetonitrilo. Em seguida, foram centrifugados a 13000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi injetado em duplicado e analisado por HPLC, a um comprimento de onda 300 nm, num fluxo de 1,00 mL/min e nas condições apresentadas na **Tabela 2.2**. Os ensaios foram feitos em triplicado.

As velocidades iniciais foram determinadas pelo declive da reta da fase inicial de reação do decréscimo da concentração de pró-fármaco em função do tempo. As constantes catalíticas foram determinadas através de uma regressão não-linear de Michaelis-Menten, por recurso ao programa Graphpad Prism 5, Graphpad Software Inc. A cinética enzimática dos compostos **18a** e **18d** seguiram um comportamento representado matematicamente, pela **Equação 2.5**.

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \text{ (Equação 2.5)}$$



## Procedimento Experimental

**Tabela 2.2** – Tempos de retenção e eluentes usados nos ensaios cinéticos com tampão fosfato 0,01 M pH7,4, em plasma humano e em presença do enzima tirosinase a 37 °C dos pró-fármacos **18a-f** e **19a,b**.

Composto	Produto	Tampão Fosfato	Plasma Humano	Enzima	Eluentes
<b>18a</b>	CN-Amina	1,74	1,73	2,10	50ACN:50H <sub>2</sub> O
	CN-MMT	2,39	2,78	2,80	
	Intermediário	-	-	5,98	
	PF	9,35	9,43	9,27	
<b>18b</b>	COOCH <sub>3</sub> -Amina	1,38	1,61	1,98	60ACN:40H <sub>2</sub> O
	COOCH <sub>3</sub> -MMT	1,56	2,48	2,61	
	Intermediário	-	-	5,11	
	PF	5,50	7,44	7,55	
<b>18c</b>	CONH <sub>2</sub> -Amina	2,50	1,30	1,33	Gradiente: 2min 5ACN:95H <sub>2</sub> O; 8min 50ACN:50H <sub>2</sub> O; 10min 5ACN:95H <sub>2</sub> O; 3min 60ACN:40H <sub>2</sub> O
	CONH <sub>2</sub> -MMT	4,62	4,56	4,61	
	Intermediário	-	-	6,08	
	PF	6,60	6,11	6,91	
<b>18d</b>	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -Amina	1,54	1,72	2,00	55ACN:45H <sub>2</sub> O
	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -MMT	1,78	2,69	2,65	
	Intermediário	-	-	5,15	
	PF	7,60	7,36	7,20	
<b>18e</b>	COCH <sub>3</sub> -Amina	2,43	2,52	3,00	50ACN:50H <sub>2</sub> O
	COCH <sub>3</sub> -MMT	3,22	3,00	3,52	
	Intermediário	-	-	5,09	
	PF	5,22	6,14	6,54	
<b>18f</b>	CH <sub>3</sub> -Amina	2,00	1,96	2,09	60ACN:40H <sub>2</sub> O
	CH <sub>3</sub> -MMT	3,00	3,72	3,36	
	Intermediário	-	-	3,25	
	PF	4,61	4,51	4,73	
<b>19a</b>	CN-Amina	1,79	1,71	-	Gradiente: 1min 40ACN:60H <sub>2</sub> O; 4min 5ACN:95 H <sub>2</sub> O; 3min 40ACN:60 H <sub>2</sub> O
	CN-MMT	2,72	2,64	-	
	Intermediário	-	-	-	
	PF	6,47	6,39	6,51	
<b>19b</b>	COOCH <sub>3</sub> -Amina	1,89	1,70	-	Gradiente: 1min 40ACN:60 H <sub>2</sub> O; 4min 5ACN:95 H <sub>2</sub> O; 3min 40ACN:60 H <sub>2</sub> O
	COOCH <sub>3</sub> -MMT	2,59	2,15	-	
	Intermediário	-	-	-	
	PF	8,14	6,02	6,53	

### 2.5.5 Estudos Cinéticos com Formulações Lipossomais

Os estudos cinéticos com as formulações lipossomais foram realizados de acordo com o descrito nos Cap. 2.5.2, 2.5.2 e 2.5.4. Houve cuidado com o volume adicionado de formulação lipossomal para esta corresponder à mesma concentração de pró-fármaco usada nos ensaios com os pró-fármacos livres.

## Procedimento Experimental

### 2.5.6 Curvas de Calibração

De forma a validar os resultados obtidos nos ensaios cinéticos e de conseguir avaliar os ensaios em termos quantitativos (concentrações) realizaram-se curvas de calibração para os pró-fármacos sintetizados, os MMTs e aminas correspondentes, nas condições descritas anteriormente (**Tabela 2.2**). Traçou-se um gráfico com as áreas dos picos em função das concentrações (M) e a reta obtida foi usada para calcular as concentrações de cada um dos padrões nos ensaios cinéticos (**Tabela 2.3** e **Figuras A6-8** em **Anexo**).

**Tabela 2.3** – Declives das retas de calibração dos pró-fármacos sintetizados, MMTs e Aminas correspondentes.

Composto	Substituinte-X	Amina	R <sup>2</sup>	MMT	R <sup>2</sup>	PF	R <sup>2</sup>
18a	CN	3,00x10 <sup>-10</sup>	0,991	1,00x10 <sup>-11</sup>	0,999	1,00x10 <sup>-11</sup>	0,999
18b	COOCH <sub>3</sub>	8,00x10 <sup>-10</sup>	0,999	9,00x10 <sup>-10</sup>	0,996	5,00x10 <sup>-10</sup>	0,999
18c	CONH <sub>2</sub>	3,00x10 <sup>-10</sup>	0,994	7,00E+10	0,994	1,00x10 <sup>-11</sup>	0,993
18d	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	8,00x10 <sup>-10</sup>	0,999	7,00x10 <sup>-10</sup>	0,999	1,00x10 <sup>-11</sup>	0,999
18e	COCH <sub>3</sub>	8,00x10 <sup>-10</sup>	0,999	9,00x10 <sup>-10</sup>	0,999	8,00x10 <sup>-10</sup>	0,999
18f	CH <sub>3</sub>	8,00x10 <sup>-10</sup>	0,998	9,00x10 <sup>-10</sup>	0,998	7,00x10 <sup>-10</sup>	0,999
19a	CN	3,00x10 <sup>-10</sup>	0,991	1,00x10 <sup>-11</sup>	0,999	9,00x10 <sup>-10</sup>	0,998
19b	COOCH <sub>3</sub>	8,00x10 <sup>-10</sup>	0,999	9,00x10 <sup>-10</sup>	0,999	9,00x10 <sup>-10</sup>	0,999

### 2.5.7 Determinação dos Coeficientes de Partilha

Através de um sistema octanol-tampão fosfato foi possível determinar os coeficientes de partilha dos compostos sintetizados. Inicialmente saturou-se o sistema colocando numa ampola de decantação uma mistura de 1:1 de octanol e tampão fosfato isotónico (0,01 M pH 7,4) e deixou-se em repouso durante dois dias.

Os coeficientes de partilha dos pró-fármacos entre octanol e tampão fosfato isotónico foram determinados a partir de um sistema bifásico constituído por octanol (saturado de tampão fosfato) e tampão fosfato (saturado de octanol) com pró-fármaco. A mistura foi agitada num vortex durante 2 minutos, centrifugada durante 10 minutos a 13000 rpm e deixada em repouso durante 15 minutos. A alíquota da fase orgânica foi diluída, numa porção de 1:40, em acetonitrilo e posteriormente analisada por HPLC. A fase aquosa foi injetada diretamente no HPLC. O coeficiente de partilha foi obtido pela razão das concentrações de pró-fármaco nas duas fases (de acordo com a **Equação 2.6**).

$$\log P = \log \frac{[PF]_{\text{octanol}}}{[PF]_{\text{tampão fosfato}}} \quad (\text{Equação 2.6})$$

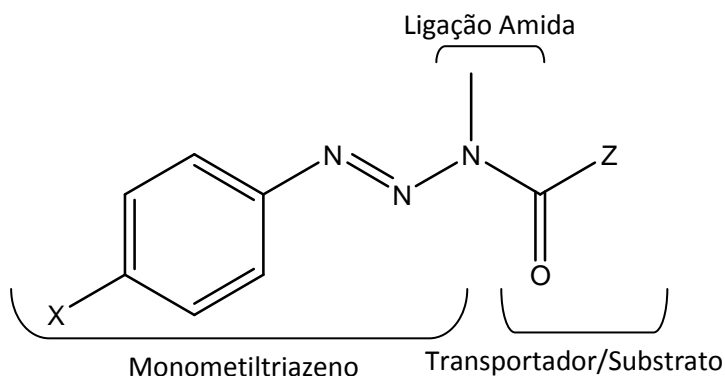
# **Capítulo 3**

## **Síntese de Pró-fármacos de Triazenos**

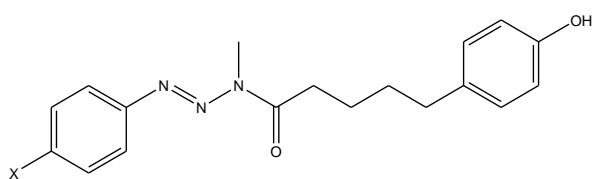
# Síntese de Pró-fármacos de Triazenos

## 3.1 Introdução

A síntese dos pró-fármacos de triazenos anti tumorais, envolveu a formação de uma ligação amida, resultante da junção entre um grupo carboxílico (do transportador/substrato) e uma amina (de um derivado do monometiltriazeno) (**Figura 3.1**). Neste trabalho, foram sintetizados os compostos **18a-f**, **19a,b** e **20a,b** (**Figura 3.2-3.4**, **Tabela 3.1-3.3**).



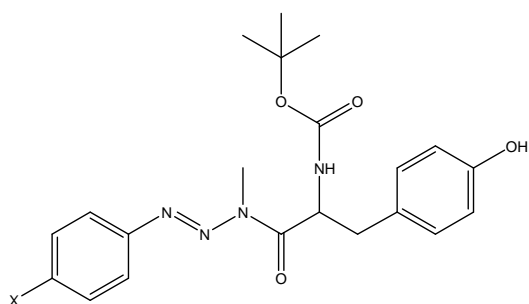
**Figura 3.1** – Representação da ligação amida.



**Figura 3.2** – Pró-fármacos **18** sintetizados.

**Tabela 3.1** – Pró-fármacos **18** sintetizados.

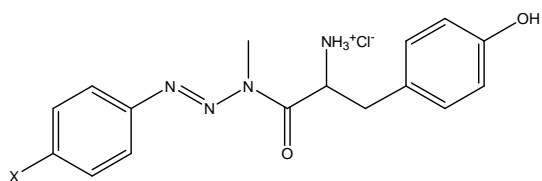
Composto	Substituinte-X
<b>18a</b>	CN
<b>18b</b>	COOCH <sub>3</sub>
<b>18c</b>	CONH <sub>2</sub>
<b>18d</b>	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>18e</b>	COCH <sub>3</sub>
<b>18f</b>	CH <sub>3</sub>



**Figura 3.3** – Pró-fármacos **19** sintetizados.

**Tabela 3.2** – Pró-fármacos **19** sintetizados.

Composto	Substituinte-X
<b>19a</b>	CN
<b>19b</b>	COOCH <sub>3</sub>



**Figura 3.4** – Pró-fármacos **20** sintetizados.

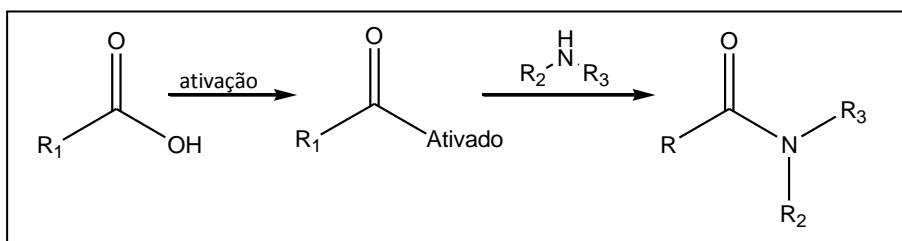
**Tabela 3.3** – Pró-fármacos **20** sintetizados.

Composto	Substituinte-X
<b>20a</b>	CN
<b>20b</b>	COOCH <sub>3</sub>

## Síntese de Pró-Fármacos de Triazenos

As ligações amida são muito importantes e estão presentes em muitas moléculas biológicas como enzimas e proteínas e também em muitos pró-fármacos. Este tipo de ligação dá às moléculas muita estabilidade na hidrólise em meio aquoso, a pH fisiológico, e em hidrólises enzimáticas [49].

Para se efetuar este tipo de acoplamento encontram-se descritos na literatura uma variedade enorme de métodos de síntese [50-52], que envolvem a junção de um ácido carboxílico e uma amina, no entanto esta junção é um processo difícil que não ocorre espontaneamente à temperatura ambiente. Deste modo, recorre-se por vezes ao aumento da temperatura da reação ou procede-se à ativação do ácido carboxílico, um processo que requer a conversão do grupo hidroxílico (-OH) num melhor grupo abandonante (**Figura 3.5**) [49].



**Figura 3.5** – Ativação do ácido carboxílico.

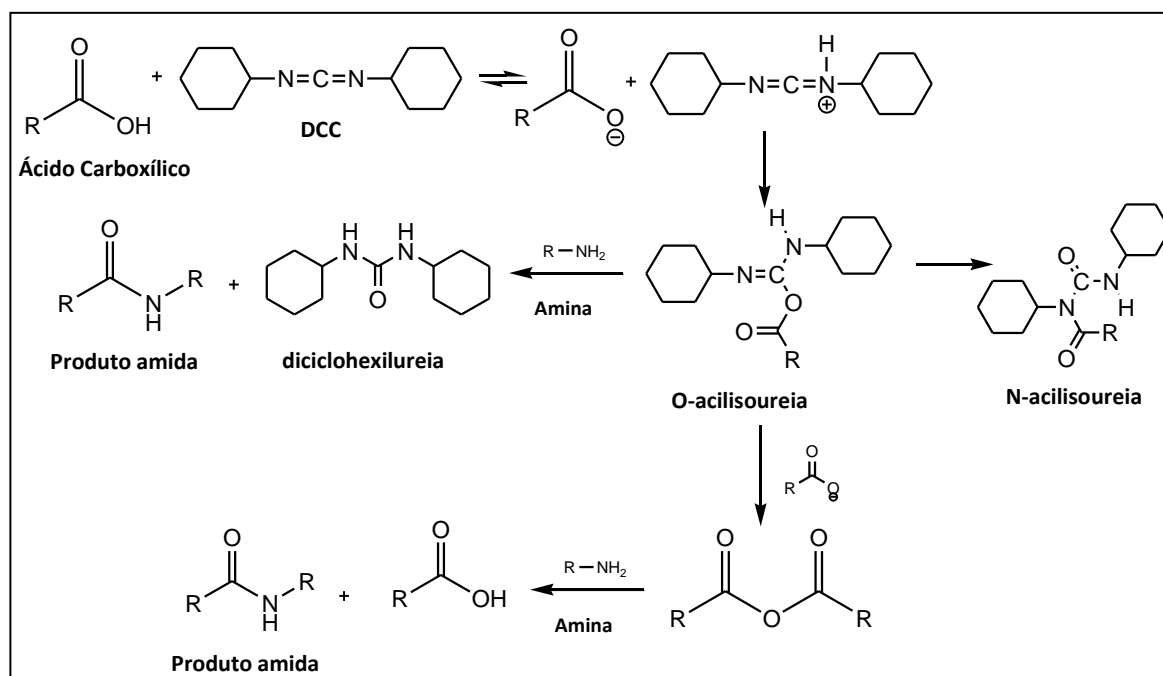
Os métodos mais estudados e que mostram melhores rendimentos são os que utilizam agentes de acoplamento que ativam e tornam o ácido carboxílico mais reativo. A escolha do agente de acoplamento depende da estequiometria e da conformação dos precursores. Esta escolha é bastante importante para que a reação seja mais eficiente e rápida em determinadas condições [50,51]. Os agentes carbodiimidas, como a diciclohexilcarbodiimida (DCC), e derivados de triazina, como o cloridrato de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolina (DMTMM), são exemplos de agentes de acoplamento usados na ativação de ácidos carboxílicos para a síntese de ligações amida.

# Síntese de Pró-fármacos de Triazenos

## 3.1.1 Ativação do Ácido Carboxílico

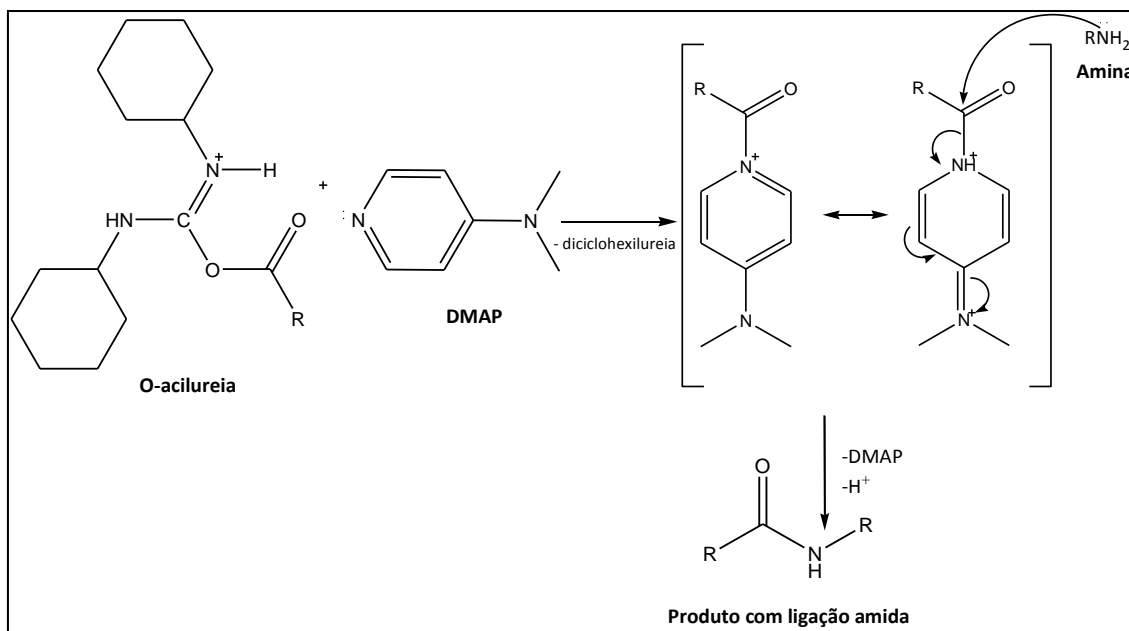
### 3.1.1.1 Ativação com DCC

A diciclohexilcarbodiimida (DCC) tem sido muito usada como agente de acoplamento, onde o primeiro passo envolve a adição da função carbodiimida ao grupo carboxílico, resultando na formação de um agente de acilação – O-acilisoureira. A formação deste agente é rápida e subsequentemente pode ser atacado por um grupo amina dando origem ao produto amida pretendido e/ou a uma espécie não-reativa (N-acilisoureira). A O-acilisoureira também pode reagir com outro ácido carboxílico formando o produto amida pretendido (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6** – Ativação do ácido carboxílico pelo agente de acoplamento DCC. Adaptado de [49]

Para prevenir e diminuir a reação secundária que forma o intermediário não-reativo (N-acilisoureira), por vezes é usado o composto 4-dimetilaminopiridina (DMAP) [52]. Este reage com a O-acilisoureira e forma uma espécie intermediária que reage diretamente com o grupo amina e é também usada a trietilamina como base. O produto secundário – N,N'-diciclohexilureia (ureído) – que se forma durante a reação e que precipita pode ser removido da mistura reacional por filtração (**Figura 3.7**).



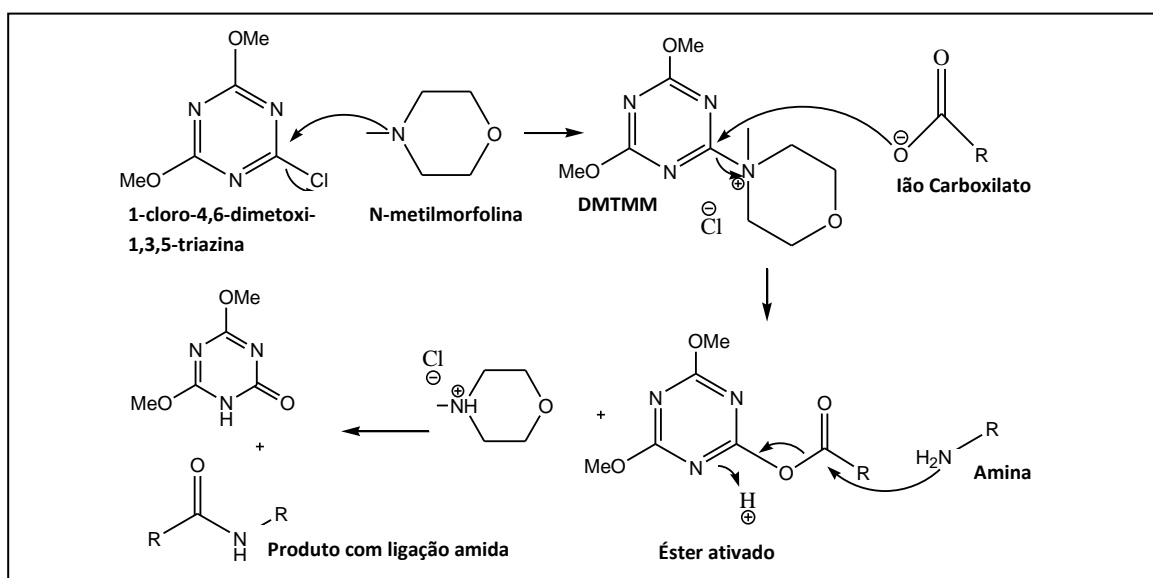
**Figura 3.7** – Formação da ligação amida através da ativação pelo agente de acoplamento DCC e o catalisador DMAP. Adaptado de [51]

A ativação com o DCC é dependente do solvente. A ativação dá-se rapidamente em solventes com constantes dielétricas baixas como o  $\text{CHCl}_3$  ou  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  onde a formação do intermediário O-acilureia é instantânea. Solventes dipolares apróticos, como a dimetilformamida (DMF), normalmente também são usados para ultrapassar problemas de solubilidade dos reagentes. No entanto, como DMF não facilita a produção do intermediário (O-acilureia), o solvente tetrahidrofurano (THF) (também aprótico) é o escolhido para este tipo de reações. Este possui uma constante dielétrica relativamente baixa, que ajuda a ultrapassar o problema da solubilidade dos reagentes [51].

### 3.1.1.2 Ativação com DMTMM

Outro agente de acoplamento também usado é o cloridrato de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolina (DMTMM), derivado da triazina que tem a vantagem particular de promover sínteses de amidas em meios aquosos com maior seletividade que o DCC [51]. Este agente forma-se a partir de uma reação de substituição nucleofílica aromática da N-metilmorfolina com 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (**Figura 3.8**). A N-metilmorfolina também desprotona o ácido carboxílico formando um íon carboxilato. Este reage com DMTMM para formar um éster ativado que sofre ataque nucleofílico pela amina formando assim a ligação amida.

## Síntese de Pró-fármacos de Triazenos

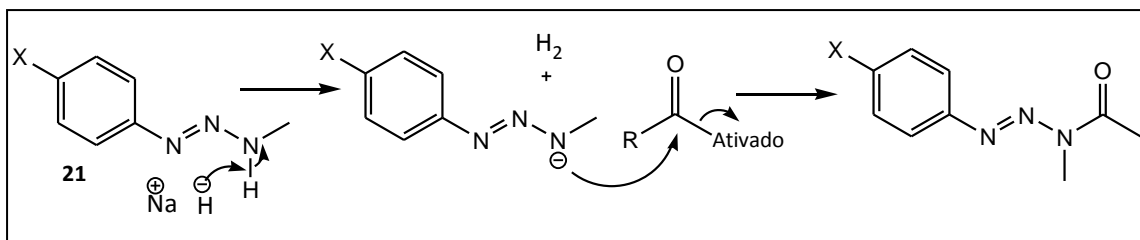


**Figura 3.8** – Formação da ligação amida através da ativação com DMTMM. Adaptado de [51]

Nesta metodologia, os produtos secundários gerados são solúveis em água e facilmente removidos por extração aquosa. Como não existem reações secundárias, o uso de catalisadores (como o DMAP) não é necessário. Quando o DMTMM é dissolvido em solventes polares próticos como o metanol ou água, os iões formados são facilmente solvatados, por isso este tipo de reação deve ser feita com solventes menos polares para que os ataques nucleofílicos se deem [51].

### 3.1.2 Ativação do Grupo Amina

No sentido de promover a formação da ligação amida, o grupo amina também pode ser ativado. Na síntese dos pró-fármacos **18a-e** e **19a,b**, o grupo amina do monometiltriazeno **21** (X-MMT), responsável pelo ataque nucleofílico, foi ativado pelo hidreto de sódio (NaH) (**Figura 3.9**). Este é uma base forte que promove a desprotonação do átomo de azoto N-metil. O processo de desprotonação gera uma carga negativa no átomo de azoto, aumentando a sua nucleofilia e promovendo a ligação amida entre o X-MMT e o ácido carboxílico ativado.



**Figura 3.9** – Ativação da ligação amida com ativação do grupo amina



### 3.2 Resultados e Discussão

#### 3.2.1 Síntese de Pró-fármacos de Triazenos

Os pró-fármacos foram sintetizados usando diferentes metodologias como representado nos esquemas anteriores (e descrito detalhadamente no Cap. 2.3). Inicialmente, experimentou-se a metodologia com o DCC pois em trabalhos anteriores esta metodologia mostrou ser rápida e eficaz com rendimentos da ordem dos 21 a 73 % [19,36,53]. Para os pró-fármacos **18a-d** e **19a** e **19b** os rendimentos foram baixos - 8 a 18 % (**Tabela 3.2**). O baixo rendimento pode ser devido à dificuldade em eliminar o produto secundário (ureído), prejudicando o processo de purificação ou devido ao solvente usado (THF) não ser totalmente favorável às condições da reação [51].

Utilizando outro agente de acoplamento – DMTMM, os rendimentos obtidos para os pró-fármacos **18e** e **18f** foram ligeiramente superiores (de 18 e 23 %, respetivamente). O facto de os derivados do MMT serem relativamente instáveis no meio reacional (degradando-se na amina correspondente) e o átomo de azoto com o grupo metil do MMT ser um nucleófilo fraco faz com que a reação continue a não ser muito favorável. Alguns problemas de solubilidade foram enfrentados, o que pode ter prejudicado o rendimento final da reação. Apesar de tudo, esta abordagem de síntese mostrou ser mais rápida e com um processo de purificação mais fácil, relativamente ao método com o DCC.

O desbloqueamento do grupo BOC para os compostos **20a** e **20b** foi feito como descrito anteriormente (Cap. 2.3.1) com rendimentos entre de 23 e 70 %, respetivamente, o que sugere que a reação para o composto **20b** foi mais favorável, talvez devido ao substituinte do MMT (COOCH<sub>3</sub>) ser mais estável nas condições da reação.

O grau de pureza dos compostos sintetizados foi também avaliado através do intervalo de temperatura quando determinado o ponto de fusão dos compostos (**Tabela 3.4**).

## Síntese de Pró-fármacos de Triazenos

**Tabela 3.4** – Metodologias usadas para cada pró-fármaco, rendimento (%) e ponto de fusão (p.f.) (°C) obtidos.

Composto	Substituinte-X	Método	Rendimento (%)	p.f. (°C)
<b>18a</b>	CN	DCC	13	156-159
<b>18b</b>	COOCH <sub>3</sub>	DCC	10	105-107
<b>18c</b>	CONH <sub>2</sub>	DCC	18	121-124
<b>18d</b>	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	DCC	8	113-117
<b>18e</b>	COCH <sub>3</sub>	DMTMM	20	115-118
<b>18f</b>	CH <sub>3</sub>	DMTMM	26	120-124
<b>19a</b>	CN	DCC	9	95-98
<b>19b</b>	COOCH <sub>3</sub>	DCC	18	153-157
<b>20a</b>	CN	Desbloqueamento do BOC	23	115-120**
<b>20b</b>	COOCH <sub>3</sub>	Desbloqueamento do BOC	70	*

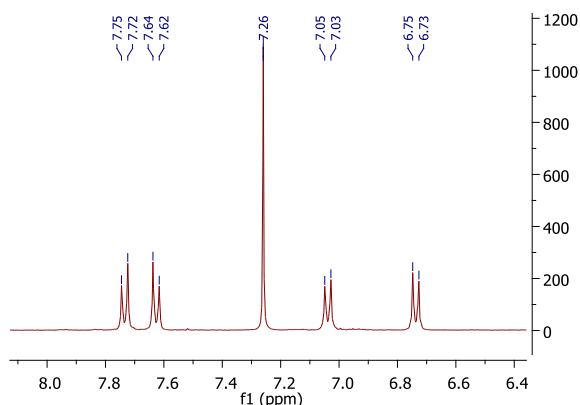
\*composto em forma de óleo

### 3.2.2 Caracterização Espectroscópica

Todos os compostos sintetizados foram caracterizados por técnicas espectroscópicas, como ressonância magnética nuclear <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR e <sup>13</sup>C-DEPT-135-NMR e Infravermelho (IV).

#### <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR e <sup>13</sup>C-DEPT-135-NMR – Ressonância Magnética Nuclear

Através de <sup>1</sup>H-NMR conseguimos observar sinais muito característicos presentes em todos os pró-fármacos sintetizados [54]. Os prótons correspondentes ao grupo N-CH<sub>3</sub> do monometiltriazeno (X-MMT) foram sempre representados por um singlete com desvio químico à volta dos 3,4 ppm. Também foi possível observar os sinais correspondentes dos prótons aromáticos do X-MMT e do substrato, como sistema AA'XX' ou AA'BB', dependendo do grupo substituinte-X dos MMTs (**Figura 3.10**). Estes picos são representados por dois pares de dupletos (cada anel tem dois pares) que se encontram entre 6,6 e 7,1 ppm e 7,6 e 8,1 ppm para o anel aromático correspondente ao ácido e ao triazeno, respetivamente.



**Figura 3.10** – Ampliação do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do pró-fármaco **18a**. Sistemas AA'XX' e AA'BB', dos prótons dos aromáticos do transportador e do X-MMT, respectivamente.

O sinal correspondente ao grupo hidroxilo (-OH) do substrato não se observou em nenhum dos espectros. Cada substituinte do anel aromático do MMT também apresentou sinais muito particulares, como é o caso do singlete a 3,9 ppm do grupo éster metílico para o pró-fármaco **18b** (valores dos desvios químicos nas **Tabelas 3.5a** e **Tabela 3.5b** e espectros **Figuras A.1, A.2 e A.3** em **Anexo**).

Os espectros de  $^{13}\text{C}$ -NMR e  $^{13}\text{C}$ -DEPT-135-NMR (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) permitem também como os espectros de próton, retirar informações relativas à estrutura das moléculas. Os desvios químicos observados em cada um dos espectros para os pró-fármacos **18, 19 e 20** estão apresentados no Cap. 2.3.3 (espectro em **Anexo, Figura A.4 e A.5**).

### IV – Infra-vermelho

Através da análise espectroscópica de Infravermelho (IV) é possível observar que as bandas correspondentes à função amida apareceram em todos os compostos entre 1610 e 1697  $\text{cm}^{-1}$ , de acordo com os valores tabelados na literatura [16]. As bandas correspondentes aos grupos substituintes do MMT foram bem identificados e os valores obtidos em cada um dos espectros de IV para os pró-fármacos **18, 19 e 20** estão apresentados no Cap. 2.3.3 (e espectro em **Anexo, Figura A.6**).

**Tabela 3.5a** – Desvios químicos de  $^1\text{H}$ -NMR dos pró-fármacos **18a-f**.

Composto	Substituinte-X	X-H	X-ArH	NCH <sub>3</sub>	NCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	NCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> PheH	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> PheH	PheH
18a	CN	-	7,74 (2H, J=12Hz, AA'BB') 7,63 (2H, J=8Hz, AA'BB')	3,44 (3H, s)	2,60 (2H, t, J=8Hz)	1,70 (2H, m)	1,76 (2H, m)	2,94 (2H, t, J=8Hz)	7,04 (2H, J=8Hz, AA'XX') 6,74 (2H, J=8Hz, AA'XX')
18b	COOCH <sub>3</sub>	3,90 (3H, s)	8,01 (2H, J=8Hz, AA'XX') 7,63 (2H, J=8Hz, AA'XX')	3,39 (3H, s)	2,54 (2H, t, J=8Hz)	1,68 (4H, m)	2,94 (2H, t, J=8Hz)	6,96 (2H, J=8Hz, AA'XX') 6,64 (2H, J=8Hz, AA'XX')	
18c	CONH <sub>2</sub>	-	7,96 (2H, J=8Hz, AA'XX') 7,62 (2H, J=8Hz, AA'XX')	3,38 (3H, s)	2,53 (2H, t, J=8Hz)	1,68 (4H, m)	2,93 (2H, t, J=8Hz)	6,96 (2H, J=8Hz, AA'XX') 6,94 (2H, J=8Hz, AA'XX')	
18d	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	4,39 (2H,q,J=8Hz) 1,41 (3H, t, J=8Hz)	8,13 (2H, J=8Hz, AA'XX') 7,69 (2H, J=8Hz, AA'XX')	3,40 (3H, s)	2,59 (2H, t, J=8Hz)	1,71 (4H, m)	2,97 (2H, t, J=8Hz)	7,05 (2H, J=8Hz, AA'XX') 6,62 (2H, J=8Hz, AA'XX')	
18e	COCH <sub>3</sub>	2,64 (3H, s)	8,03 (2H, J=8Hz, AA'XX') 7,61 (2H, J=8Hz, AA'XX')	3,45 (3H, s)	2,59 (2H, t, J=8Hz)	1,70 (2H, m)	1,78 (2H, m)	2,95 (2H, t, J=8Hz)	7,03 (2H, J=8Hz, AA'XX') 6,76 (2H, J=8Hz, AA'XX')
18f	CH <sub>3</sub>	2,40 (3H, s)	7,47 (2H, J=8Hz, AA'XX') 7,23 (2H, J=8Hz, AA'XX')	3,41 (3H, s)	2,59 (2H, t, J=8Hz)	1,69 (2H, m)	1,77 (2H, m)	2,94 (2H, t, J=8Hz)	7,03 (2H, J=8Hz, AA'XX') 6,73 (2H, J=8Hz, AA'XX')

**Tabela 3.5b** – Desvios químicos de  $^1\text{H}$ -NMR dos pró-fármacos **19a,b** e **20a,b**.

Composto	Substituinte-X	X-H	X-ArH	NCH <sub>3</sub>	$\alpha$ -CH	N-H	NHCOC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> PheH	PheH
<b>19a</b>	<b>CN</b>	-	7,71 (2H, J=8Hz, AA'BB') 7,62 (2H, J=8Hz, AA'BB')	3,39 (3H, s)	5,62 (1H, q, J=8Hz)	5,30 (1H, d, J=8Hz)	1,42 (9H,s)	2,98 (2H, t, J=8Hz)	6,91 (2H, J=8Hz, AA'XX') 6,61 (2H, J=8Hz, AA'XX')
<b>19b</b>	<b>COOCH<sub>3</sub></b>	3,95 (2H, s)	8,09 (2H, J=8Hz, AA'XX') 7,60 (2H, J=8Hz, AA'XX')	3,40 (3H, s)	5,64 (1H, d, J=8Hz)	5,37 (1H, d, J=8Hz)	1,42 (9H, s)	2,96; 3,00 (2H, dd, J=4Hz, J=8Hz)	6,93 (2H, J=8Hz, AA'XX') 6,62 (2H, J=8Hz, AA'XX')
<b>20a</b>	<b>CN</b>	-	7,83 (2H, J=8Hz, AA'XX') 7,61 (2H, J=8Hz, AA'XX')	3,36 (3H, s)	5,26 (1H, t, J=8 Hz)	-	-	3,12 (2H, m)	6,91 (2H, J=8Hz, AA'XX') 6,48 (2H, J=8Hz, AA'XX')
<b>20b</b>	<b>COOCH<sub>3</sub></b>	3,92 (3H, s)	8,11 (2H, J=8Hz, AA'XX') 7,59 (2H, J=12Hz, AA'XX')	3,38 (3H,s)	5,26 (1H, t, J=4Hz)	-	-	3,11; 3,13 (2H, d, J=8Hz)	6,94 (2H, J=8Hz, AA'XX') 6,53 (2H, J=8Hz, AA'XX')

### 3.3 Conclusões

Uma nova série de pró-fármacos de triazenos foi sintetizada, apesar dos rendimentos obtidos serem relativamente baixos. A nível de metodologias de síntese, a ativação do ácido carboxílico através do DMTMM mostrou ser mais favorável em termos de rendimento e de rapidez. Os rendimentos baixos obtidos podem ser explicados pela reatividade intrínseca do ácido 5-(4-hidroxifenil)pentanóico e dos MMTs, que são instáveis e podem sofrer facilmente processos de decomposição no meio reacional. O composto que apresentou maior rendimento de síntese foi o **20b** e o menor o composto **18d**, talvez devido à metodologia de síntese e/ou dificuldade na purificação. As quantidades obtidas de cada pró-fármaco permitiram a incorporação dos mesmos em lipossomas e a realização dos ensaios cinéticos dos compostos.

Para melhorar os rendimentos obtidos haverá interesse em experimentar outros solventes ou outras metodologias de síntese. De acordo com o que está descrito na literatura, a metodologia com carbodiimidas apresenta melhores rendimentos quando são usados solventes com constantes dieléctricas baixas [50,52], no entanto estes deverão ser capazes de dissolver os reagentes da reação. O clorofórmio e o diclorometano, podem ser solventes a serem testados. As carbodiimidas 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida ou N-ciclohexil-N'-terc-butilcarbodiimida deverão ser usadas, de forma a perceber qual delas tem maior afinidade para o substrato usado [51]. Outros agentes de acoplamento, como o o-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametiluroniotetrafluoroborato (TBTU) e outras metodologias, como o uso de micro-ondas, também seriam interessantes de testar e assim averiguar as diferenças no rendimento de síntese [50,52,56,57].



## **Capítulo 4**

# **Incorporação de Pró-fármacos em Lipossomas**

# Incorporação de Pró-Fármacos em Lipossomas

---

## 4.1 Introdução

Os lipossomas têm um papel importante na veiculação de fármacos uma vez que, de acordo com as suas características, podem permitir um aumento da estabilidade das moléculas associadas, uma alteração no perfil de biodistribuição após administração *in vivo* [43], bem como, em vários meios reacionais, prolongam o seu tempo em circulação.

Tal como referido no Cap. 1.7.1, os lipossomas podem ser constituídos por vários constituintes lipídicos conferindo propriedades físico-químicas variadas. De forma a avaliar qual a melhor composição para a incorporação foram selecionados os pró-fármacos **18a** e **18d**, uma vez que possuíamos maior quantidade de composto, mais conhecimento sobre os mesmos e para se poder comparar com outros ensaios posteriores com pró-fármacos semelhantes. Foram preparadas várias formulações que variaram em grau de insaturação e em carga global dos fosfolípidos constituintes [58].

O grau de insaturação dos fosfolípidos tem uma grande influência na permeabilidade das bicamadas lipídicas e consequentemente na estabilidade da molécula associada aos lipossomas. Com efeito, cada fosfolípido apresenta uma temperatura de transição de fase (t.t.f.) característica à qual as cadeias de ácidos gordos da molécula transitam de um estado de grande ordenação, com uma conformação distendida e firmemente empacotadas, para um estado de considerável mobilidade. Abaixo da t.t.f. os fosfolípidos encontram-se rígidos, com uma estrutura bem organizada, fase gel-sólida, e acima da t.t.f. numa fase cristal líquida-fluída. A preparação de lipossomas deve ser sempre realizada a uma temperatura superior à respetiva t.t.f. do fosfolípido utilizado e, no caso de uma mistura de fosfolípidos, a temperatura é determinada pela t.t.f. mais elevada.

A carga superficial não é um parâmetro que influencia a preparação dos lipossomas, mas sim o mecanismo e interação dos lipossomas com os componentes celulares. O potencial zeta é definido como a diferença de potencial elétrico da superfície membranar e o meio de dispersão fornecendo deste modo informações acerca da carga superficial dos lipossomas. A composição lipídica utilizada e o pH da solução tampão são fatores que afetam o valor de potencial zeta. Em geral, lipossomas com carga, negativa ou positiva, promovem a interação lipossoma-célula e têm uma menor tendência de agregar devido às repulsões eletrostáticas, aumentando a estabilidade em suspensão.

A preparação dos lipossomas e a determinação dos seus parâmetros físico-químicos foram feitos como descrito no Cap. 2.4.



# Incorporação de Pró-fármacos em Lipossomas

Posteriormente, a seleção das formulações para a realização dos ensaios cinéticos foi baseada na obtenção de lipossomas com eficácias de incorporação mais elevadas.

## 4.2 Resultados e Discussão

Os lipossomas foram preparados com uma concentração de lípido inicial de 30  $\mu\text{mol/mL}$  e uma razão molar inicial de pró-fármaco/lípido 1:30. As composições lípidicas utilizadas foram – fosfatidilcolina (PC), – mistura lipídica de PC com fosfatidilglicerol (PG) (7:3), – dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e – mistura lipídica de DMPC com dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG)(7:3) para a incorporação dos dois pró-fármacos – **18a** e **18d**. Os resultados correspondentes à caracterização físico-química das formulações lipossomais para os dois pró-fármacos apresentam-se nas **Tabelas 4.1 e 4.2**.

**Tabela 4.1** – Caracterização físico-química de formulações lipossomais contendo o pró-fármaco **18a**: influência da composição lipídica.

Formulação	Composição Lipídica (razão molar) [t.t.f]	(PF/Lip) <sub>i</sub> (nmol/ $\mu\text{mol}$ )	(PF/Lip) <sub>f</sub> (nmol/ $\mu\text{mol}$ )	E.I. (%)	$\emptyset$ ( $\mu\text{m}$ ) Pdl	Potential Zeta (mV)
<b>F1</b>	<b>PC</b> [-6 °C]	43 $\pm$ 1	33 $\pm$ 5	77 $\pm$ 12	0.18 (<0,2)	-2,5 $\pm$ 0,3
<b>F2</b>	<b>PC:PG</b> <b>(7:3)</b> [-6 °C/-6 °C]	43 $\pm$ 1	32 $\pm$ 3	75 $\pm$ 8	0.16 (<0,2)	-27,3 $\pm$ 2,3
<b>F3</b>	<b>DMPC</b> [+23 °C]	47 $\pm$ 1	37 $\pm$ 1	78 $\pm$ 2	0.23 (<0,2)	-4,0 $\pm$ 1,0
<b>F4</b>	<b>DMPC:DMPG</b> <b>(7:3)</b> [+23 °C/+23 °C]	41 $\pm$ 1	28 $\pm$ 4	68 $\pm$ 7	0,14 (<0,2)	-29,0 $\pm$ 1,9

# Incorporação de Pró-Fármacos em Lipossomas

**Tabela 4.2** – Caracterização físico-química de formulações lipossomais contendo o pró-fármaco **18d**: influência da composição lipídica.

Formulação	Composição Lipídica (razão molar) [t.t.f]	(PF/Lip)i (nmol/μmol)	(PF/Lip)f (nmol/μmol)	E.I. (%)	Ø (μm) Pdl	Potential Zeta (mV)
<b>F5</b>	<b>PC</b> [-6 °C]	42 ± 8	34 ± 2	84 ± 19	0.18 (<0,2)	-3 ± 0,7
<b>F6</b>	<b>PC:PG</b> <b>(7:3)</b> [-6 °C/-6 °C]	43 ± 9	30 ± 1	71 ± 13	0.15 (<0,2)	-29 ± 1,7
<b>F7</b>	<b>DMPC</b> [+23 °C]	33 ± 3	38 ± 3	114 ± 14	0.17 (<0,2)	-4 ± 0,9
<b>F8</b>	<b>DMPC:DMPG</b> <b>(7:3)</b> [+23 °C/+23 °C]	27 ± 14	15 ± 8	52 ± 8	0.17 (<0,2)	-28 ± 1,6

De um modo geral, para todas as formulações testadas obtiveram-se lipossomas com um diâmetro médio entre 0,14 e 0,23 μm e um índice de polidispersão (Pdl) inferior a 0,2 demonstrando a elevada homogeneidade das vesículas preparadas. O diâmetro médio dos lipossomas obtido está de acordo com o esperado, pois as membranas de policarbonato de porosidade inferior usadas na extrusão das suspensões lipossomais tinham um poro de 0,2 μm. O diâmetro das vesículas preparadas pode não só influenciar os parâmetros de incorporação, como também o comportamento do lipossoma durante e após entrada na corrente sanguínea. De um modo geral, quanto maior for o diâmetro dos lipossomas, mais rápida será a sua eliminação da circulação sanguínea [44].

Os valores de potencial-zeta obtidos para os lipossomas testados estão de acordo com os constituintes lipídicos das respectivas formulações. A inclusão de fosfolípidos carregados negativamente, PG e DMPG, resultaram na obtenção de formulações com valores de potencial zeta entre -27 e -29 mV para as formulações **F2**, **F4**, **F6** e **F8**. Por outro lado as formulações **F1**, **F3**, **F5** e **F7**, preparadas apenas com fosfolípidos neutros, PC e DMPC, apresentaram valores de potencial zeta entre -2,5 e -4 mV.

A determinação da concentração lipídica e de pró-fármaco permitiu calcular as razões de pró-fármaco/lípido iniciais e finais. Os valores obtidos para estas duas razões permitiram avaliar as perdas de pró-fármaco e de lípido durante o processo de preparação dos lipossomas.

## Incorporação de Pró-fármacos em Lipossomas

---

Assim de acordo com os dados apresentados na **Tabela 4.1** para a incorporação do pró-fármaco **18a**, os valores de  $[PF/Lip]_f$  foram sempre inferiores aos valores de  $[PF/Lip]_i$  para as formulações estudadas. As Eficácias de Incorporação (E.I.) para todas as formulações **F1**, **F2**, **F3** e **F4** variaram entre 68 a 78% independentemente da composição lipídica.

A incorporação do pró-fármaco **18d** em lipossomas, de acordo com os resultados apresentados na **Tabela 4.2**, foi dependente da composição lipídica utilizada. Os valores mais baixos foram observados para a formulação **F8** com uma E.I. de 52 %.

Apesar de não terem sido realizados estudos de calorimetria de varrimento diferencial para determinação da temperatura de transição de fase das várias formulações, é de esperar que as formulações constituídas por lípidos com o grupo dimirtistoil (DM) apresentem uma t.t.f. aproximadamente de 23 °C (formulações **F3** e **F4**), enquanto as formulações **F1** e **F2** apresentem uma t.t.f. inferior a 0 °C [59].

Com base nos resultados obtidos, as formulações **F3** e **F7** preparadas com o fosfolípido DMPC, de carga neutra, foram selecionadas para a determinação da estabilidade dos pró-fármacos em presença de tampão fosfato salino e plasma humano. A razão desta escolha teve a ver com o facto de ambas as formulações apresentarem E.I. elevadas (superiores a 78%) e pelo facto deste fosfolípido, comparativamente ao PC também com carga neutra, ter uma t.t.f. superior e por isso poder eventualmente resultar numa maior estabilidade do pró-fármaco incorporado.

### 4.3 Conclusões

Os resultados obtidos permitiram constatar que foi possível a associação dos dois pró-fármacos selecionados (**18a** e **18d**) em lipossomas, com elevados níveis de incorporação. A utilização destas formulações poderá permitir uma proteção do pró-fármaco da hidrólise química e enzimática em presença de fluidos biológicos. Por outro lado, em virtude das propriedades hidrofóbicas destes pró-fármacos, os lipossomas podem funcionar também como agentes solubilizantes eliminando o uso de solventes tóxicos. De referir, ainda que a incorporação de pró-fármacos em lipossomas, poderá alterar substancialmente o perfil de distribuição *in vivo* destas moléculas [58].

No entanto, ainda podem ser testadas outras formulações, como por exemplo, formulações que contenham polietileno glicol (PEG), para aumentar o tempo de circulação das formulações na corrente sanguínea [44]. A conjugação de certas moléculas à superfície do lipossoma, como moléculas com estrutura molecular semelhante a um substrato do enzima tirosinase, poderiam mostrar resultados surpreendentes. Esta abordagem poderia fazer com que o enzima tirosinase, depois de reconhecer a molécula como substrato, destruísse o lipossoma e libertasse o seu conteúdo.

# **Capítulo 5**

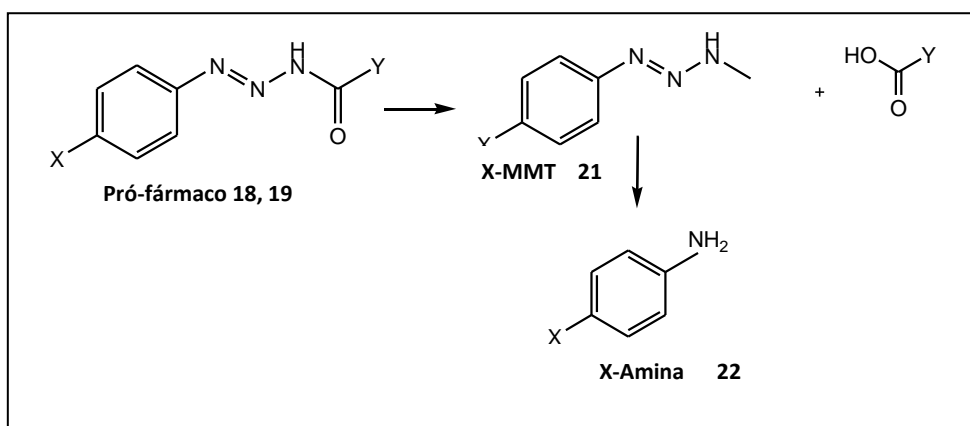
## **Avaliação dos compostos como Pró-fármacos de Triazenos**

# Avaliação dos compostos como Pró-fármacos de Triazenos

## 5.1 Introdução

De forma a avaliar o potencial dos compostos sintetizados **18a-f** e **19a,b** como pró-fármacos, estudou-se a estabilidade dos mesmos em vários meios. Assim, estudou-se a hidrólise química dos pró-fármacos em tampão fosfato salino (0,01 M, pH 7,4), a hidrólise em plasma humano e ainda em presença do enzima tirosinase. Também foram feitos estudos cinéticos comparando a estabilidade dos pró-fármacos na forma livre e incorporada nos lipossomas. Os estudos cinéticos permitiram elucidar se os compostos sintetizados são suficientemente estáveis em condições semelhantes às fisiológicas e ainda avaliar a afinidade para a tirosinase e a eficácia de libertação do agente citotóxico (X-MMT). Com estes dados podemos concluir acerca da potencialidade dos compostos para aplicação na estratégia em MDEPT.

As cinéticas foram seguidas por HPLC e foram identificados e quantificados os produtos de hidrólise dos pró-fármacos (X-MMT **21** e a X-Amina **22**), bem como o desaparecimento do próprio pró-fármaco (**18a-f** ou **19a,b**) (Figura 5.1).



**Figura 5.1** – Degradação dos pró-fármacos. (X = CN (**18a,19a**), COOCH<sub>3</sub> (**18b,19b**), CONH<sub>2</sub> (**18c**), COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (**18d**), COCH<sub>3</sub> (**18e**), CH<sub>3</sub> (**18f**), Y = derivado do ácido hidroxifenil pentanóico (**18**); e do N-(terc-Butoxicarbonil)-L-tirosina (**19**)). Adaptado de [60]

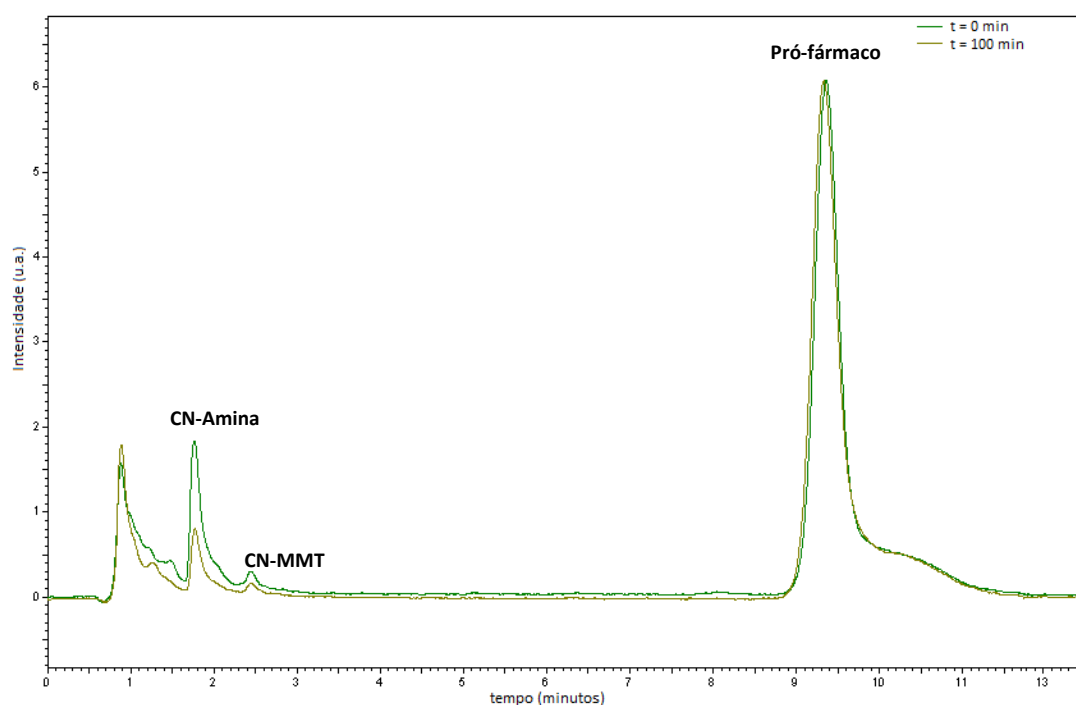
## 5.2 Resultados e Discussão

### 5.2.1 Escolha das condições ideais para os estudos de HPLC

Para realizar os estudos de estabilidade por HPLC foi necessário escolher o melhor eluente, para que os tempos de retenção de cada um dos compostos (pró-fármaco e seus produtos de degradação) não ficassem sobrepostos permitindo calcular as integrações das áreas dos mesmos nos cromatogramas. As condições usadas encontram-se descritas no Cap. 2.5, **Tabela 2.2**.

### 5.2.2 Estudo Cinético em Tampão Fosfato Salino

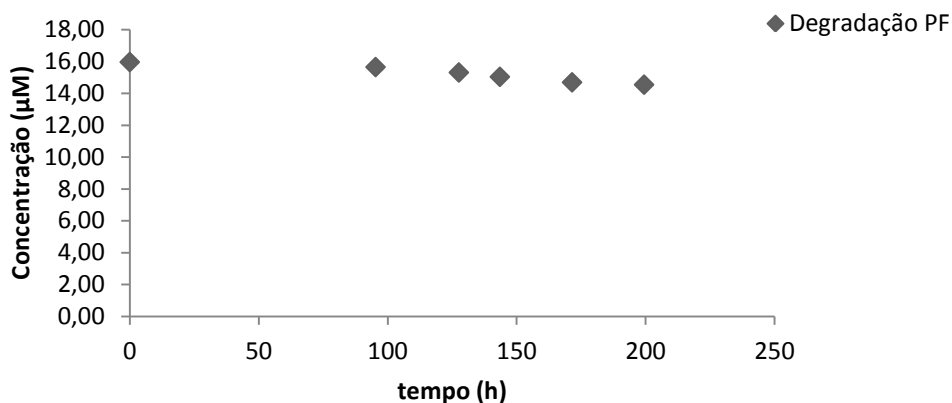
Realizou-se o ensaio de hidrólise dos pró-fármacos sintetizados **18a-f** e **19a,b** bem como dos pró-fármacos **18a** e **18d** incorporados em lipossomas, em tampão fosfato (0,01 M pH 7,4) a 37 °C por HPLC, como descrito no Cap. 2.5.1. Observou-se uma ligeira diminuição da área do pró-fármaco e o aparecimento dos produtos de hidrólise – o agente citotóxico X-MMT, que se degrada na respetiva amina (X-Amina) (**Figura 5.1**) – que foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões (em **Anexo, Figura A.8**). Na **Figura 5.2** são apresentados os cromatogramas referentes ao pró-fármaco **18a**.



**Figura 5.2** – Cromatogramas a diferentes tempos (0 e 100 horas) do ensaio cinético em tampão fosfato salino (0,01 M pH 7,4) a 37 °C do pró-fármaco **18a** ( $t_{\text{retenção}} \text{CN-Amina} = 1,74 \text{ min}$ ,  $t_{\text{retenção}} \text{CN-MMT} = 2,39 \text{ min}$ ,  $t_{\text{retenção}} \text{PF} = 9,35 \text{ min}$ ).

## Avaliação dos compostos como Pró-fármacos de Triazenos

Recorrendo às curvas de calibração (em **Anexo, Figuras A.9-11**), calculou-se a concentração dos pró-fármacos ao longo do tempo e podemos afirmar que são estáveis em condições semelhantes às fisiológicas. Na **Figura 5.3** estão apresentados as concentrações do pró-fármaco **18a** ao longo de 200 horas.



**Figura 5.3** – Variação da concentração (µM) do pró-fármaco **18a** no ensaio cinético em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4 a 37 °C ao longo do tempo.

**Tabela 5.1** – Valores das constantes de velocidade ( $k_{obs}$ ), respectivos  $R^2$  e tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) dos compostos **18** e **19** sintetizados e **18a** e **18d** incorporados em lipossomas, em tampão fosfato salino (0,01 M pH 7,4) a 37 °C.

Composto	Substituinte-X	$k_{obs}$ (h <sup>-1</sup> )	$R^2$	$t_{1/2}$ (h)
<b>18a</b>	CN	-	-	**
<b>18a (incorporado em lipossomas)</b>	CN	-	-	**
<b>18b</b>	COOCH <sub>3</sub>	0,006*	0,971	123,78*
<b>18c</b>	CONH <sub>2</sub>	0,004*	0,991	182,41*
<b>18d</b>	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-	-	**
<b>18d (incorporado em lipossomas)</b>	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-	-	**
<b>18e</b>	COCH <sub>3</sub>	-	-	**
<b>18f</b>	CH <sub>3</sub>	-	-	**
<b>19a</b>	CN	0,014*	0,999	48,47*
<b>19b</b>	COOCH <sub>3</sub>	0,005*	0,977	123,77*

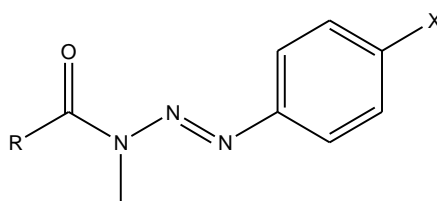
\*foi realizado um único ensaio

\*\*estável durante 15 dias



Analisando os dados da **Tabela 5.1** verificamos que os tempos de meia-vida são superiores a 100 horas, ou seja, em condições fisiológicas os pró-fármacos **18** e **19a** são estáveis. O pró-fármaco **19b** apesar de apresentar um valor de tempo meia-vida menor ( $t_{1/2} = 48,5$  h) é igualmente estável em tampão fosfato salino. Para os pró-fármacos **18a** e **18d** observámos que não houve alteração na estabilidade quando incorporados em lipossomas.

Estudos cinéticos realizados nas mesmas condições com pró-fármacos aminoaciltriazenos **23** (**Figura 5.4**) apresentaram valores de tempo de meia-vida muito inferiores, na ordem dos 55 e 105 minutos [53]. Estas diferenças nos tempos de meia-vida podem ser atribuídas ao facto destes últimos apresentarem o grupo amina livre logo sujeito a protonação, o que possivelmente favorece a hidrólise química.

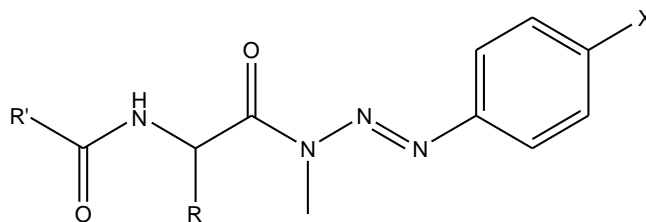


**23a** R = CH(CH<sub>3</sub>)NH<sub>2</sub>, X = CH<sub>3</sub>;

**23b** R = CH(CH<sub>2</sub>Ph)NH<sub>2</sub>, X = CN; COCH<sub>3</sub>

**Figura 5.4** – Pró-fármacos aminoaciltriazenos **23**. Retirado de [53]

Pró-fármacos triazenos derivados de N-acil-aminoácidos **24** [13] (**Figura 5.5**) mostraram ser mais estáveis dos que os aminoacil triazenos **23**, no entanto, apresentam tempos de meia-vida na ordem das 9 e 13 horas, ou seja, menos estáveis que os pró-fármacos **18**.



**24a** R = CH<sub>2</sub>Ph, R' = CH<sub>3</sub>, X = CN;

**24b** R = CH<sub>3</sub>, R' = Ph, X = CN

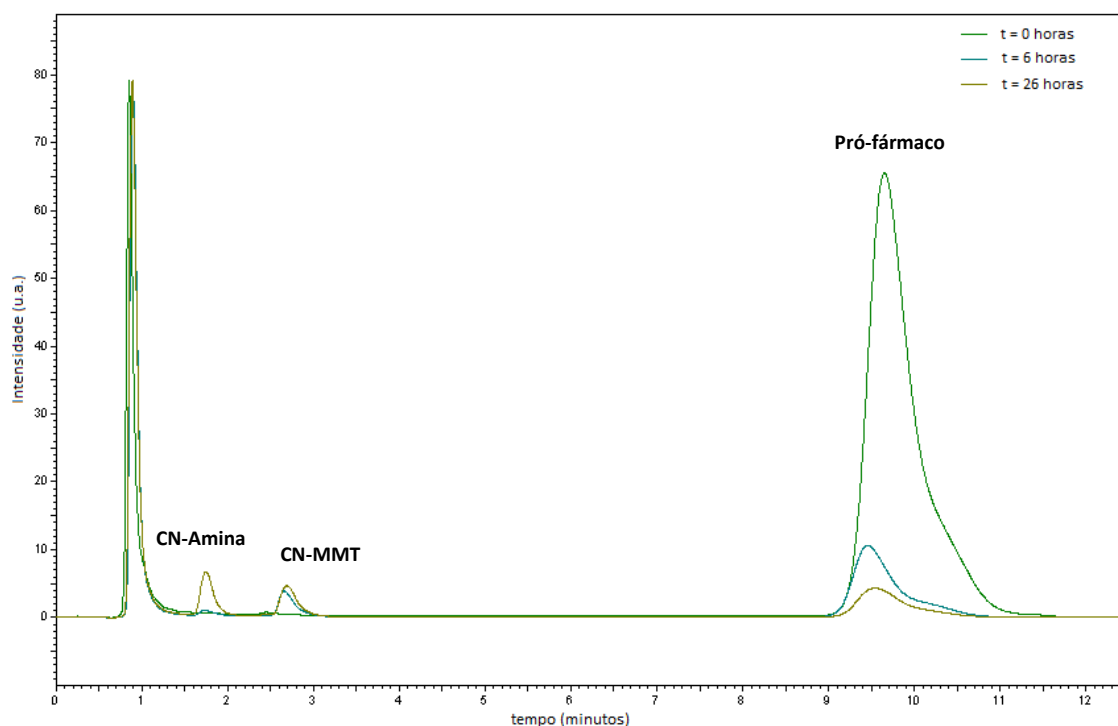
**Figura 5.5** – Pró-fármacos N-acil-aminoácido **24**. Retirado de [13]

Tendo em conta que a diferença estrutural dos pró-fármacos **23** e **24** em relação aos pró-fármacos **18** e **19** é apenas a nível do transportador, pois o tipo de ligação (amida) e o agente citotóxico (X-MMT) é o mesmo, pode-se afirmar que o transportador tem influência na estabilidade da estrutura molecular dos pró-fármacos. Como os pró-fármacos **18** apresentaram maiores tempos de meia-vida, concluímos que a unidade transportadora utilizada para os pró-fármacos **18**, dá à estrutura global da molécula um efeito estabilizador maior.

Os resultados deste estudo cinético mostraram que os pró-fármacos **18** e **19** são suficientemente estáveis em condições fisiológicas sendo também interessante a avaliação da sua estabilidade em plasma humano e em presença do enzima tirosinase.

### 5.2.3 Estudo Cinético em Plasma Humano

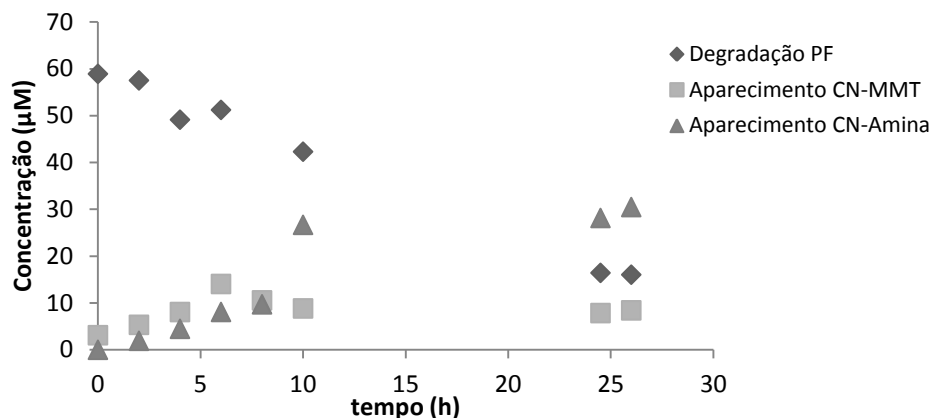
No ensaio cinético em plasma humano, diluído a 80% (v/v) com tampão fosfato salino (0,01 M pH 7,4) para os pró-fármacos sintetizados **18a-f** e **19a,b**, bem como para os pró-fármacos **18a** e **18d** incorporados em lipossomas, as reações foram também seguidas por HPLC (descrito no Cap. 2.5.2). Observou-se o desaparecimento do pico correspondente ao pró-fármaco, o aparecimento dos picos correspondentes aos produtos de degradação – o agente citotóxico X-MMT, que se degrada na respetiva amina (X-Amina) – ao longo do tempo (**Figura 5.1**). Na **Figura 5.6** são apresentados os cromatogramas referentes ao pró-fármaco **18a**.



**Figura 5.6** – Cromatogramas a diferentes tempos (0, 6 e 26 horas) do ensaio cinético em plasma humano 80% (v/v) do pró-fármaco **18a** ( $t_{\text{retenção}}$  CN-Amina=1,73 min,  $t_{\text{retenção}}$  CN-MMT=2,78 min,  $t_{\text{retenção}}$  PF=9,43 min).

Através das curvas de calibração (em **Anexo, Figuras A.9-11**), calcularam-se também as concentrações de cada um dos produtos da reação, permitindo deste modo avaliar a relação que existe entre eles ao longo do tempo (**Figura 5.7**).

## Avaliação dos compostos como Pró-fármacos de Triazenos



**Figura 5.7** – Variação das concentrações ( $\mu\text{M}$ ) do pró-fármaco **18a**, monometiltriazeno (CN-MMT) e respetiva amina (CN-Amina), em plasma humano 80% (v/v) ao longo do tempo.

Para todos os pró-fármacos calcularam-se também as percentagens de concentração dos vários componentes envolvidos na reação, os valores das constantes de velocidade ( $k_{\text{obs}}$ ) (e respetivos  $R^2$ ) e os tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) em plasma humano 80% (v/v), determinados a partir da **Equação 2.3** e **Equação 2.4** (**Tabela 5.2**).

**Tabela 5.2** – Valores das concentrações de pró-fármaco (PF), X-MMT e X-Amina (%), das constantes de velocidade ( $k_{\text{obs}}$ ), respetivos  $R^2$  e tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) dos compostos **18** e **19** sintetizados e **18a** e **18d** incorporados em lipossomas, em plasma humano 80% (v/v), a 37 °C.

Composto	Substituinte-X	% degradação do PF**	% formação X-MMT**	% formação X-Amina**	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$R^2$	$t_{1/2}$ (h)
<b>18a</b>	CN	$97,3 \pm 3,3$	$19,0 \pm 1,3$	$20,0 \pm 1,3$	$0,06 \pm 0,004$	0,981	$11,84 \pm 0,87$
<b>18a</b> (incorporado em lipossomas)	CN	$97,7 \pm 1,4$	$10,3 \pm 4,6$	$15,5 \pm 3,4$	$0,02 \pm 0,004$	0,961	$38,88 \pm 7,25$
<b>18b</b>	$\text{COOCH}_3$	$90,3 \pm 4,6$	$16,7 \pm 3,2$	$9,2 \pm 2,3$	$0,04 \pm 0,0006$	0,995	$17,45 \pm 0,34$
<b>18c</b>	$\text{CONH}_2$	$92,5 \pm 3,2$	$10,3 \pm 3,4$	$13,8 \pm 4,5$	$0,01 \pm 0,002$	0,988	$55,42 \pm 8,24$
<b>18d</b>	$\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	$94,4 \pm 3,5$	$9,7 \pm 2,3$	$9,5 \pm 1,0$	$0,03 \pm 0,002$	0,995	$26,30 \pm 2,85$
<b>18d</b> (incorporado em lipossomas)	$\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	$98,0 \pm 1,8$	$17,7 \pm 2,3$	$26,7 \pm 3,2$	$0,03 \pm 0,0009$	0,995	$22,97 \pm 0,72$
<b>18e</b>	$\text{COCH}_3$	$96,3 \pm 3,3$	n.q.	n.q.	$0,02 \pm 0,004$	0,978	$32,74 \pm 6,78$
<b>18f</b>	$\text{CH}_3$	$98,9 \pm 1,5$	n.q.	n.q.	$0,007 \pm 0,002$	0,986	$79,67 \pm 0,05$
<b>19a</b>	CN	$93,3 \pm 9,6$	$9,8 \pm 1,3$	$21,1 \pm 2,9$	$0,09 \pm 0,006$	0,992	$8,12 \pm 0,62$
<b>19b</b>	$\text{COOCH}_3$	$90,0 \pm 0,71$	$8,2 \pm 0,07$	$15,2 \pm 6,1$	$0,08 \pm 0,004$	0,998	$9,05 \pm 0,51$

\*\*% máxima observada no ensaio

## Avaliação dos compostos como Pró-fármacos de Triazenos

---

Observando os valores apresentados na **Tabela 5.2**, verificamos que os tempos de meia-vida obtidos neste ensaio, para os pró-fármacos **18** foram da ordem das 12 a 80 horas. Reparando nas percentagens das concentrações dos compostos é possível afirmar que existe decomposição do pró-fármaco quase na totalidade e há libertação do agente citotóxico (X-MMT) e decomposição na respetiva amina, na ordem dos 9 a 20 %. Estes resultados mostraram que todos os pró-fármacos **18** sintetizados são substratos dos enzimas do plasma, pois foram hidrolisados mais rapidamente no plasma do que em tampão fosfato salino. No entanto, podemos considerá-los suficientemente estáveis em plasma e por isso bons candidatos para a estratégia MDEPT.

Em relação ao pró-fármaco **18a**, a sua incorporação em lipossomas resultou num aumento do tempo de meia-vida em relação à forma livre: de 11,8 para 38,9 h. Para o pró-fármaco **18d** não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as formas livre e lipossomal. As percentagens de concentração observadas para os pró-fármacos incorporados nos lipossomas e os seus produtos de hidrólise mantiveram-se semelhantes aos ensaios realizados com os pró-fármacos na forma livre. Desta observação podemos afirmar que apesar do pró-fármaco **18a** ser mais estável quando incorporado em lipossomas, verifica-se igualmente a libertação do agente citotóxico.

As características físico-químicas dos lipossomas normalmente facilitam a estabilidade dos compostos, pois ensaios realizados a 37 °C permitem que a bicamada do fosfolípido esteja numa fase termodinâmica fluida e permeável resultando na permanência do pró-fármaco dentro do lipossoma durante algum tempo [59].

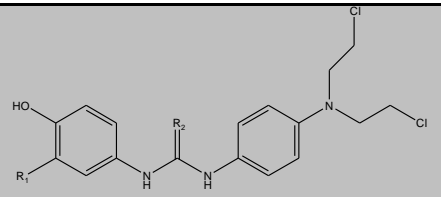
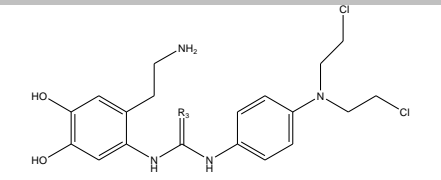
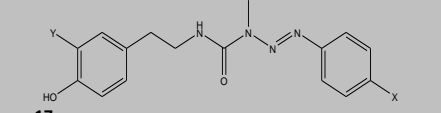
Em relação aos pró-fármacos **19**, estes mostraram ser menos estáveis que o conjunto de compostos **18**, talvez devido à estrutura química conter um grupo volumoso (grupo BOC). Este grupo pode favorecer a degradação dos compostos pelos componentes do plasma. Os dados obtidos das percentagens de concentração dos produtos de hidrólise permitem-nos concluir que apesar de serem menos estáveis, a libertação do agente citotóxico é observada e da mesma grandeza que os pró-fármacos **18**.

Os pró-fármacos **18a-f** e **19a,b** mostraram mais uma vez o facto de serem mais estáveis que os pró-fármacos aminoaciltriazenos **23** e N-acil-aminoácidos **24** (com ligações amida). A estabilidade dos pró-fármacos **18a-f** e **19a,b** também é superior aos pró-fármacos **15b,d**, **16b** e **17e,g** apresentados anteriormente (Cap. 1.6) (**Tabela 5.3**). Os compostos **15b,d** e **16b**, com ligação tioureia, apresentaram um tempo de meia-vida inferior a 5 h e os compostos

## Avaliação dos compostos como Pró-fármacos de Triazenos

**17e,g** (com ligação ureia) inferior a 10 h. Este facto vem confirmar que a ligação amida concomitantemente com uma estrutura estável no transportador torna os pró-fármacos **18** e **19** mais estáveis no plasma [33,35,36].

**Tabela 5.3** – Tempos de meia-vida (h) dos pró-fármacos **15b,d**, **16b**, em albumina de soro bovino e **17e,g**, em plasma humano a 80 % (v/v) e a 37 °C. Retirado de [33,35,36]

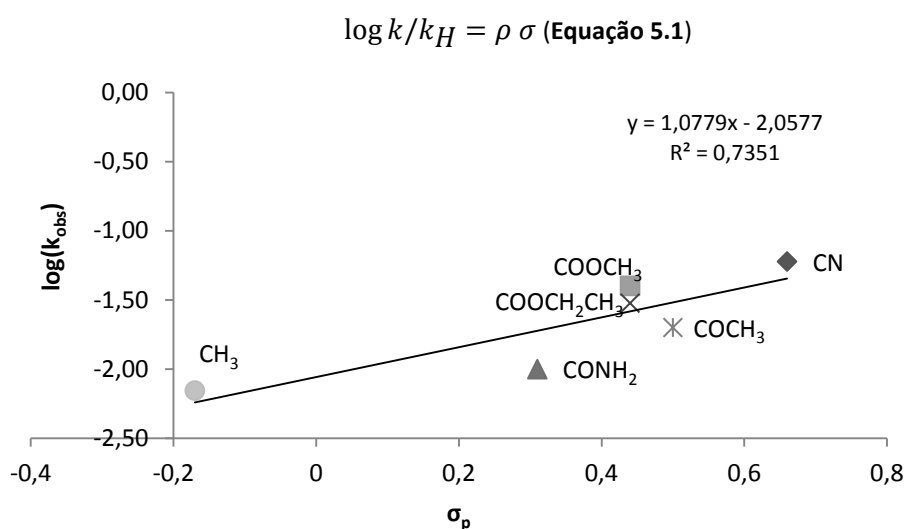
Pró-fármaco	$t_{1/2}$ (h)
 <p><b>15b</b> <math>R_1 = H; R_2 = S;</math>  <b>15d</b> <math>R_1 = OH; R_2 = S</math></p>	$\leq 5$
 <p><b>16b</b> <math>R_3 = S</math></p>	$\leq 5$
 <p><b>17e</b> <math>X = CH_2CO \ Y = OH</math>  <b>17g</b> <math>X = Me \ Y = OH</math></p>	$\leq 10$

## Avaliação dos compostos como Pró-fármacos de Triazenos

### 5.2.3.1 Influência do substituinte no anel aromático da metade triazénica

Para entender a influência do substituinte no anel aromático da metade triazénica, recorreu-se à correlação de Hammett que compara o efeito eletrónico do substituinte ( $\sigma$ ) na reatividade de um determinado composto com o efeito desse mesmo substituinte numa reação padrão.

Tendo os valores de  $k_{\text{obs}}$  determinados em plasma humano 80 % (v/v) a 37 °C, para os compostos **18a-f** e os parâmetros do substituinte em *para* de cada um ( $\sigma_p$  = 0,66; 0,44; 0,31; 0,44; 0,50; -0,17, respetivamente) [61] é possível elaborar um gráfico de Hammett, aplicando a Equação 5.1.



**Figura 5.8** – Gráfico de Hammett das constantes de velocidade da decomposição dos compostos **18** em plasma humano 80 % (v/v) a 37 °C, contra os valores de  $\sigma_p$  dos respetivos substituintes.

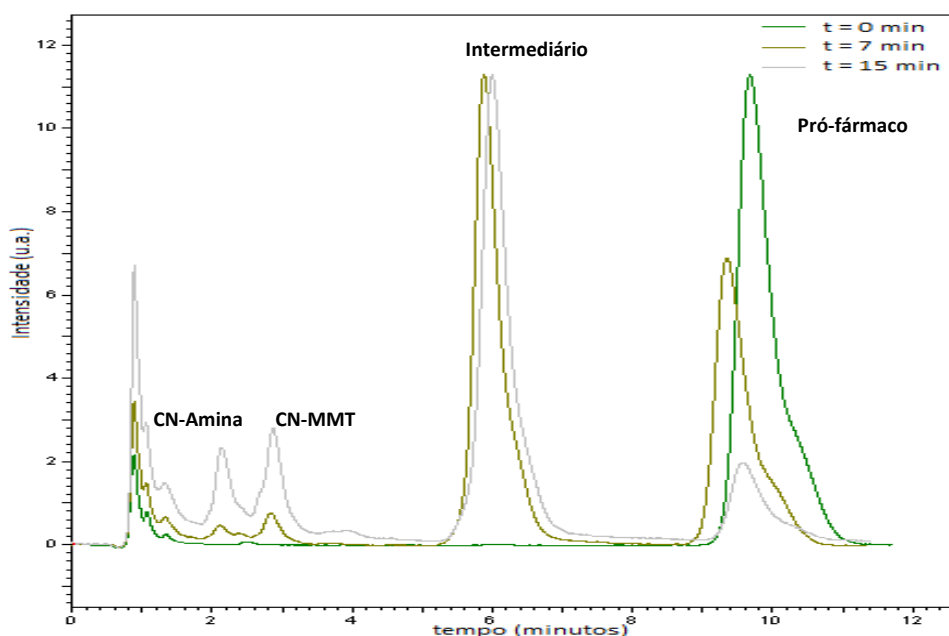
Na **Figura 5.8**, apesar de não existir uma boa correlação ( $R^2 = 0,74$ ) entre os valores de  $\log(k_{\text{obs}})$  e os valores das constantes de Hammett ( $\sigma_p$ ), a relação linear obtida, cujo declive (constante de reação,  $\rho$ ) é +1,08, indica-nos que a reação de degradação dos compostos **18** é acelerada por grupo eletroatratores.

Isto explica o facto dos compostos **18a-e** (com substituintes eletroatratores) apresentarem um menor tempo de meia-vida em relação ao composto **18f** (com substituinte CH<sub>3</sub>, eletrodoador). O substituinte electroatrator cria maior efeito eletrónico no anel aromático que por sua vez torna a ligação amida mais fraca e por isso mais suscetível de sofrer hidrólise.

## Avaliação dos compostos como Pró-fármacos de Triazenos

### 5.2.4 Estudo Cinético com Enzima Tirosinase

Para perceber a aplicabilidade destes pró-fármacos em MDEPT, isto é, se os pró-fármacos **18a-f** e **19a,b** atuavam como substratos do enzima tirosinase e se conseguiam libertar o agente citotóxico (X-MMT) foi necessário realizar ensaios enzimáticos em presença do enzima tirosinase. O ensaio foi também monitorizado por HPLC (descrito no Cap. 2.5.4), observando-se mais uma vez, a diminuição da área do pico correspondente ao pró-fármaco. Inicialmente, há o aparecimento de um pico com um tempo de retenção menor que o do pró-fármaco, o qual vai diminuindo a sua área ao longo do tempo. Surge também um pico correspondente ao agente citotóxico X-MMT, que se degrada na respetiva amina (X-Amina) ao longo da reação. Os cromatogramas obtidos para o pró-fármaco **18a** apresentam-se na **Figura 5.9**.

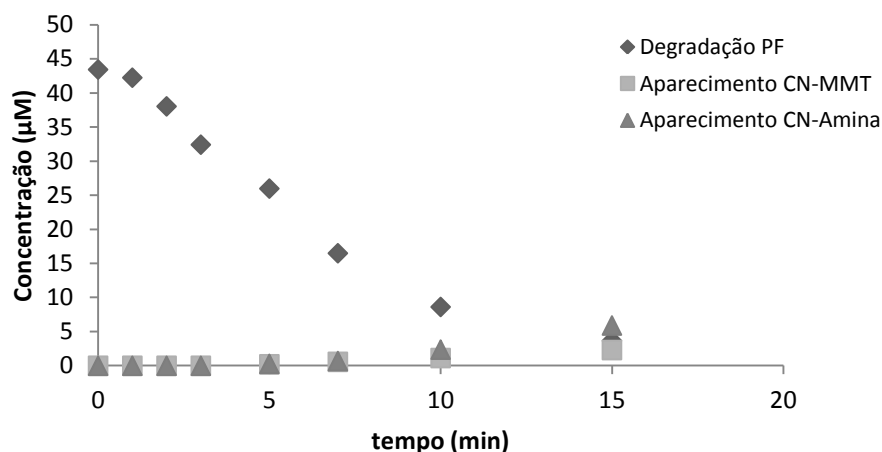


**Figura 5.9** – Cromatogramas a diferentes tempos (0, 7 e 15 minutos) do ensaio cinético com enzima tirosinase do pró-fármaco **18a** ( $t_{\text{retenção}}$  CN-Amina=2,10 min,  $t_{\text{retenção}}$  CN-MMT=2,80 min,  $t_{\text{retenção}}$  Intermediário= 5,98 min,  $t_{\text{retenção}}$  PF=9,27 min).

Para além da determinação das constantes de velocidade ( $k_{\text{obs}}$ ) e do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), também foram calculadas as concentrações do pró-fármaco, do X-MMT e da amina através de curvas de calibração (em **Anexo, Figuras A.9-11**). Os resultados obtidos para o pró-fármaco **18a** estão apresentados na **Figura 5.10** e para os restantes pró-fármacos na **Tabela 5.4**.



## Avaliação dos compostos como Pró-fármacos de Triazenos



**Figura 5.10** – Variação das concentrações ( $\mu\text{M}$ ) do pró-fármaco **18a**, monometiltriazeno (CN-MMT) e respectiva amina (CN-Amina), ao longo do tempo, com enzima tirosinase.

**Tabela 5.4** – Valores das concentrações de pró-fármaco (PF), X-MMT e X-Amina (%), das constantes de velocidade ( $k_{\text{obs}}$ ), respectivos  $R^2$  e tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) dos compostos **18** e **19** sintetizados e **18a** e **18d** incorporados em lipossomas, na presença do enzima tirosinase, a 37 °C.

Composto	Substituinte-X	% degradação do PF**	% formação X-MMT**	% formação X-Amina**	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$	$t_{1/2}$ (min)
<b>18a</b>	CN	90,4 $\pm$ 7,7	3,6 $\pm$ 0,4	6,6 $\pm$ 0,5	0,169 $\pm$ 0,03	0,981	4,2 $\pm$ 0,89
<b>18a (incorporado em lipossomas)</b>	CN	96,4 $\pm$ 2,5	2,0 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,2	0,011 $\pm$ 0,002	0,991	66,4 $\pm$ 9,93
<b>18b</b>	COOCH <sub>3</sub>	87,1 $\pm$ 6,9	0,7 $\pm$ 0,01	1,2 $\pm$ 0,09	0,199 $\pm$ 0,02	0,991	3,6 $\pm$ 0,47
<b>18c</b>	CONH <sub>2</sub>	91,7 $\pm$ 9,3	5,8 $\pm$ 2,4	7,1 $\pm$ 0,5	0,122 $\pm$ 0,02	0,988	5,8 $\pm$ 1,15
<b>18d</b>	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	88,6 $\pm$ 2,7	2,9 $\pm$ 0,9	3,0 $\pm$ 0,09	0,148 $\pm$ 0,03	0,992	4,8 $\pm$ 0,85
<b>18d(incorporado em lipossomas)</b>	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	99,3 $\pm$ 1,2	2,2 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,4	0,009 $\pm$ 0,0008	0,995	76,3 $\pm$ 6,5
<b>18e</b>	COCH <sub>3</sub>	94,8 $\pm$ 0,4	n.q.	n.q.	0,568 $\pm$ 0,08	0,980	1,31 $\pm$ 0,19
<b>18f</b>	CH <sub>3</sub>	88,3 $\pm$ 7,9	n.q.	n.q.	0,925 $\pm$ 0,32	0,978	0,74 $\pm$ 0,19
<b>19a</b>	CN	-	-	-	-	-	*
<b>19b</b>	COOCH <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	*

\*estável durante 2 horas \*\*% máxima observada no ensaio

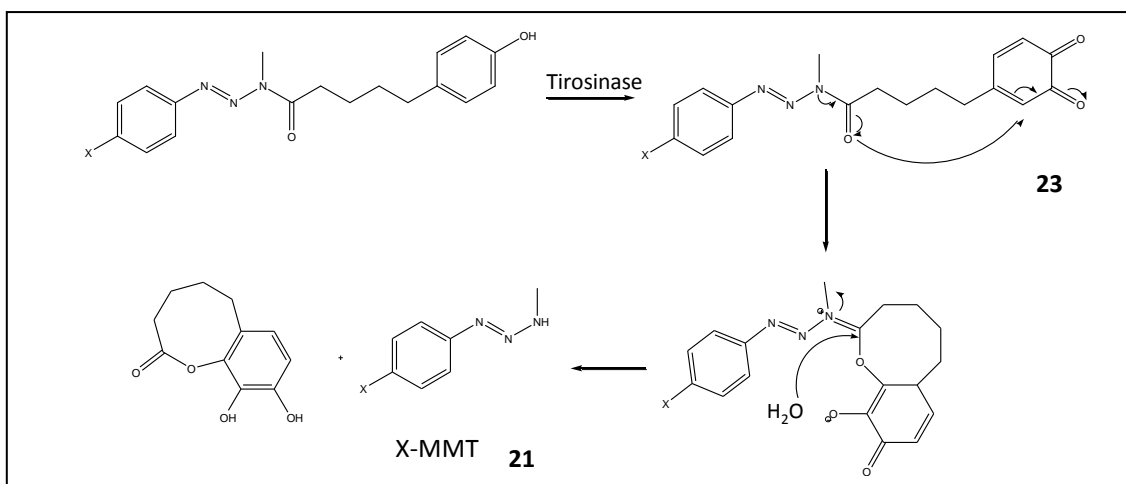
Os tempos de meia-vida para os pró-fármacos **18** na forma livre foram bastante reduzidos nestas condições, o que nos leva a concluir que os pró-fármacos **18** são facilmente reconhecidos pelo centro ativo do enzima tirosinase, e têm assim aplicabilidade na metodologia MDEPT. As percentagens de degradação dos pró-fármacos são da ordem dos 87 e 99 %, de formação do X-MMT e da X-Amina entre 1 e 7 %. Estes dados permitem-nos afirmar

## Avaliação dos compostos como Pró-fármacos de Triazenos

que os pró-fármacos conseguem libertar o agente citotóxico que por sua vez se decompõe na respectiva amina.

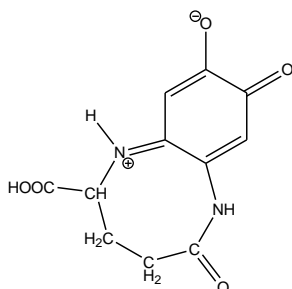
Analisando os cromatogramas dos pró-fármacos **18** (neste caso particular são apresentados os cromatogramas do pró-fármaco **18a**, **Figura 5.9**) observamos a libertação de um intermediário ( $t_{\text{retenção}}=5,98$  min) antes de ocorrer a libertação do agente citotóxico X-MMT **21** (**Figura 5.1 e 5.9**). Pensamos que este intermediário possa ser uma quinona que é estável o suficiente para ser detetada pelo HPLC (já descrita no Cap.1.6). Esta espécie intermediária também já foi observada no mesmo tipo de ensaio (para os pró-fármacos **17**) e foi identificada por LC-MS como uma quinona [36].

Com os dados obtidos e cromatogramas analisados para todos os pró-fármacos **18**, podemos sugerir um mecanismo de ativação (**Figura 5.11**).



**Figura 5.11** – Mecanismo de ativação proposto para a libertação do agente citotóxico (X-MMT) para os pró-fármacos **18** (X = CN, COOCH<sub>3</sub>, CONH<sub>2</sub>, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, COCH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>).

Os pró-fármacos **18** são oxidados pelo enzima tirosinase na ortoquinona **23** correspondente. Esta espécie pode iniciar uma ciclicação e assim libertar o X-MMT. No mecanismo que propomos, o composto formado após ciclicação possui um anel de 8 lados, o que pode ser pouco provável, no entanto já foi observado em condições semelhantes, a oxidação do glutaminilhidroxilbenzeno (GHB) pela tirosinase que levou à formação de um composto com um anel 8 lados (**Figura 5.12**) [62].



**Figura 5.12** – Composto obtido após oxidação pelo enzima tirosinase e posterior ciclização do glutaminilhidroxilbenzeno (GHB) [62].

Alguns pró-fármacos descritos na literatura apresentaram tempos de meia vida superiores aos pró-fármacos **18** sintetizados em presença do enzima tirosinase – pró-fármacos **16**,  $58 \leq t_{1/2} \leq 100$  min e pró-fármacos **17**,  $10 \leq t_{1/2} \leq 18$  min [35,36]. Podemos então concluir, que os pró-fármacos **18** apresentam maior potencialidade na terapêutica de MDEPT do que os compostos já sintetizados por outros autores.

A incorporação dos pró-fármacos **18a** e **18d** em lipossomas originou um aumento da estabilidade destes dois compostos em relação à forma livre. Os pró-fármacos não se encontram expostos ao meio externo e consequentemente necessitam de um tempo mais prolongado para serem reconhecidos pelo enzima. No entanto, as percentagens de concentração de pró-fármaco e dos seus produtos de degradação revelam que existe libertação do X-MMT e da X-Amina, tal como é observado para os pró-fármacos na forma livre. Serão necessários estudos *in vitro* em células de melanoma para comparar a atividade citotóxica destes dois compostos na forma livre e lipossomal.

Os tempos de meia-vida para os pró-fármacos **19** não foram calculados, uma vez que durante 2 horas as concentrações permaneceram estáveis e também por isso não ocorreu liberação do agente citotóxico (X-MMT). Este resultado permitiu concluir que possivelmente estes pró-fármacos não possuem afinidade para o enzima. O grupo BOC por ser muito volumoso não permite que a estrutura molecular seja reconhecida pelo centro ativo do enzima e por isso a hidrólise do pró-fármaco que prevalece é apenas química.

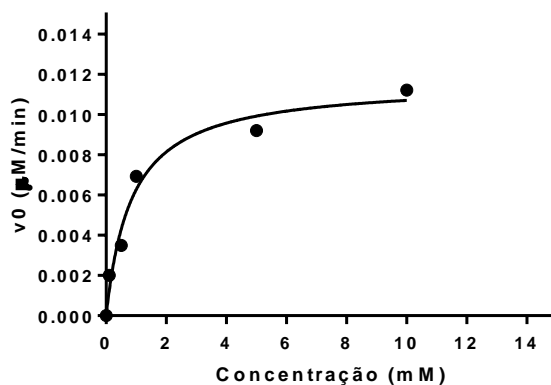
## Avaliação dos compostos como Pró-fármacos de Triazenos

### 5.2.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos para os pró-fármacos

Foram também determinados os parâmetros cinéticos – constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e velocidade máxima ( $V_{max}$ ) – para as várias concentrações de pró-fármacos **18a** e **18d** como substrato da tirosinase (tal como descrito no Cap. 2.5.3). Primeiramente, determinou-se as velocidades iniciais de degradação para o pró-fármaco **18a** para uma gama de concentrações (0 a 10 mM) (**Tabela 5.5**). De seguida os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram calculados, através de uma regressão não-linear de Michaelis-Menten (**Equação 2.5**, **Figura 5.13**). Os dados obtidos para os pró-fármacos **18a** e **18d** estão apresentados na **Tabela 5.6**.

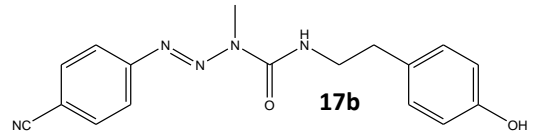
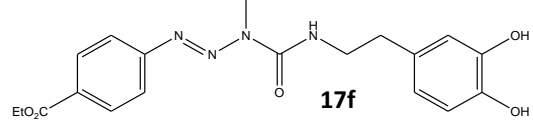
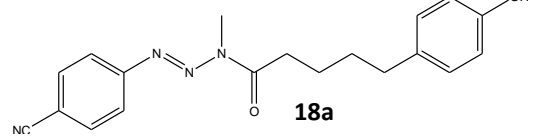
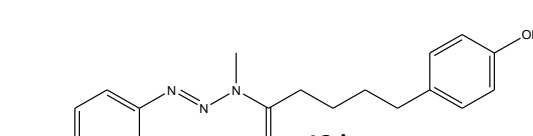
**Tabela 5.5** – Velocidades iniciais de degradação do pró-fármaco **18a** em presença do enzima tirosinase em função da concentração inicial de pró-fármaco.

Concentração de pró-fármaco (mM)	$V_0$ (velocidades iniciais) ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )
0,0	0,000
0,1	0,002
0,5	0,003
1,0	0,007
5,0	0,009
10,0	0,011



**Figura 5.13** – Regressão não-linear de Michaelis-Menten para determinação do  $K_m$  e  $V_{max}$  resultante do ensaio cinético do pró-fármaco **18a** em presença do enzima tirosinase a 37 °C.

**Tabela 5.6** – Valores das constantes catalíticas dos pró-fármacos **17b,f** e dos pró-fármacos **18a,d** sintetizados em presença do enzima tirosinase.

Composto	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>max</sub>
 <b>17b</b>	0,31 ± 0,08	0,03 ± 0,005 mM/min
 <b>17f</b>	0,71 ± 0,4	0,31 ± 0,14 mM/min
 <b>18a</b>	0,86 ± 0,22	0,012 ± 0,001 μM/min
 <b>18d</b>	1,08 ± 0,25	0,018 ± 0,001 μM/min

Foi possível observar que os pró-fármacos **18a** e **18d** apresentam uma cinética de Michaelis-Menten na gama de concentrações estudadas (**Figura 5.12** e **Figura A.12**). Os valores obtidos para o K<sub>m</sub> para os pró-fármacos **18a** e **18d** sintetizados (0,86 ± 0,22 mM e 1,08 ± 0,25 mM, respetivamente) são da mesma ordem de grandeza que os encontrados para os pró-fármacos de triazenos **17** (**Tabela 5.6**) [36]. Podemos também comparar com os valores encontrados na literatura para os substratos L-tirosina, tiramina e dopamina (K<sub>m</sub> = 0,25 ± 0,03 mM, 0,54 ± 0,05 e 0,28 ± 0,01 mM, respetivamente) [63,64] e afirmar, mais uma vez, que os compostos **18a** e **18d** são bons substratos para o enzima.

Os resultados confirmam assim que os pró-fármacos **18** têm afinidade para o enzima e que os tempos de meia-vida em presença da tirosinase se devem principalmente ao facto do enzima reconhecer os pró-fármacos como substratos.

# Avaliação dos compostos como Pró-fármacos de Triazenos

## 5.2.5 Determinação dos Coeficientes de Partilha

A determinação do coeficiente de partilha é importante para entender a solubilidade dos pró-fármacos em meio aquoso, em ambiente fisiológico e a sua permeabilidade às membranas celulares (lipídicas). Através desta determinação conseguimos aferir sobre a capacidade dos pró-fármacos atravessarem as membranas biológicas das células do melanoma maligno [20].

De acordo com o descrito na literatura, fármacos com coeficientes de partilha octanol-água iguais ou superiores a 100 ( $\log P > 2$ ) são bem absorvidos. Sendo assim, o valor  $\log P \approx 2$  é o valor de lipofilia ao qual corresponde a melhor absorção dos fármacos.

Determinaram-se os coeficientes de partilha ( $\log P_{\text{experimental}}$ ) dos pró-fármacos sintetizados **18a-f** e **19a,b** no sistema octanol-tampão fosfato isotônico (0,01 M pH 7,4) à temperatura ambiente e também são apresentados os valores de  $\log P$  calculados ( $\log P_{\text{teórico}}$ ) pelo software ALOGps 2.1 para comparação [65] (**Tabela 5.8**).

**Tabela 5.7** – Valores de  $\log P$  teóricos e determinados para os pró-fármacos sintetizados.

Composto	Substituinte-X	$\log P$ (teórico)	$\log P$ (experimental)
<b>18a</b>	CN	$4,2 \pm 0,71$	$4,3 \pm 0,05$
<b>18b</b>	COOCH <sub>3</sub>	$4,3 \pm 0,67$	$3,1 \pm 0,23$
<b>18c</b>	CONH <sub>2</sub>	$3,4 \pm 0,61$	$3,6 \pm 0,05$
<b>18d</b>	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	$4,7 \pm 0,73$	$4,5 \pm 0,22$
<b>18e</b>	COCH <sub>3</sub>	$4,4 \pm 0,79$	$4,0 \pm 0,05$
<b>18f</b>	CH <sub>3</sub>	$4,8 \pm 0,76$	$4,0 \pm 0,30$
<b>19a</b>	CN	$3,7 \pm 0,76$	$3,9 \pm 0,09$
<b>19b</b>	COOCH <sub>3</sub>	$3,9 \pm 0,72$	$4,0 \pm 0,06$

Os coeficientes de partilha obtidos encontram-se em concordância com os teóricos. Apresentam-se valores muito semelhantes, próximo de 4, o que significa que estes pró-fármacos têm um comportamento muito lipofílico. Seria interessante no futuro, estudar o comportamento destes pró-fármacos em linhas celulares para avaliar as consequências desta lipofilia.

### 5.3 Conclusões

Os estudos cinéticos permitiram entender a estabilidade dos pró-fármacos **18a-f** e **19a,b** sintetizados anteriormente. Em relação aos pró-fármacos **20** sintetizados, os dados obtidos não permitiram tirar conclusões válidas acerca da sua estabilidade nos diversos meios e por isso não são apresentados. Serão necessários mais ensaios, de forma a entender melhor a sua solubilidade e estabilidade ao longo do tempo nas diversas condições reacionais.

Portanto, para os pró-fármacos **18a-f** e **19a,b**, em tampão fosfato salino (0,01 M pH 7,4), a hidrólise química predomina e pode-se concluir que todos os pró-fármacos são bastante estáveis, sendo que alguns deles são estáveis por mais de duas semanas.

Nos ensaios em plasma humano 80% (v/v), os pró-fármacos **18a-f** e **19a,b** mostraram ser relativamente estáveis, com tempos de meia-vida elevados (11 a 80 horas e 48 a 123 horas, respetivamente). O pró-fármaco **18a** incorporado em lipossomas apresentou um tempo de meia-vida superior em relação à forma livre (38,9 e 11,8 h, respetivamente). Estatisticamente o pró-fármaco **18d** não apresentou diferença entre a forma livre e lipossomal. Apesar de tudo, é possível perceber que a incorporação de pró-fármacos em lipossomas, mostra ser uma boa abordagem para aumentar a estabilidade das moléculas no plasma. Portanto, podemos concluir que os pró-fármacos conseguem ser suficientemente estáveis até atingirem o local alvo (os melanócitos), minimizando assim os efeitos citotóxicos noutros locais indesejados.

Os estudos cinéticos frente ao enzima tirosinase, presente em grande concentração nos melanócitos malignos, permitiu-nos avaliar a aplicabilidade dos pró-fármacos na terapêutica MDEPT. Os tempos de meia-vida dos pró-fármacos **18a-f** permitem-nos concluir que estes são reconhecidos pelo centro ativo do enzima. A tirosinase oxida o pró-fármaco com a consequente libertação da quinona que por si só já é um agente citotóxico [66,67] e posteriormente dá-se a libertação do monometiltriazenó (X-MMT) que se degrada na amina correspondente. Todos os pró-fármacos **18** sintetizados mostraram tempos de meia-vida muito reduzidos e na mesma ordem de grandeza, o que nos leva a concluir que os grupos funcionais e a estrutura do agente citotóxico (X-MMT) não comprometeram a interação do substrato ao enzima. Adicionalmente, verificámos que os pró-fármacos **19a,b** apresentaram tempos de meia-vida elevados, o que significa que o enzima tirosinase não reconhece substratos que tenham grupos muito volumosos a acilar o grupo amina, pois impedem estereoquimicamente a interação entre o substrato com o centro ativo do enzima.

A incorporação dos pró-fármacos em lipossomas, permitiu entender que os lipossomas protegem o pró-fármaco, fazendo com que este não se encontre livre, não se degradando por isso com tanta facilidade no plasma. Podemos afirmar que os lipossomas têm

## Avaliação dos compostos como Pró-fármacos de Triazenos

---

realmente um papel importante como transportadores e protetores dos pró-fármacos no ambiente fisiológico, permitindo ainda um direcionamento preferencial para os órgãos afetados. Na literatura encontra-se descrito que a incorporação de moléculas citostáticas em lipossomas resulta numa atividade intracelular superior comparativamente à do respetivo fármaco na forma livre. Este facto é devido à internalização superior dos lipossomas nas células comparativamente à observada na forma livre [68,69].

A determinação do coeficiente de partição do pró-fármaco permitiu-nos inferir sobre a sua lipofilia, um parâmetro importante que influencia absorção, biodisponibilidade, interações com os recetores, metabolismo e até a toxicidade do mesmo. Os valores obtidos de logP foram concordantes com os teóricos, superiores a 4, ou seja, muito lipofílicos.

Finalmente podemos concluir que os pró-fármacos **18** são estáveis, têm afinidade para o enzima tirosinase com libertação do agente citotóxico que são condições promissoras para estes pró-fármacos serem aplicados na terapia MDEPT.



## 5.4 Perspetivas Futuras

De forma a dar continuidade ao trabalho apresentado, outras experiências devem ser realizadas para consolidar, averiguar algum dos resultados obtidos e confirmar a potencialidade dos pró-fármacos para aplicação na terapia MDEPT:

- Identificação dos produtos de decomposição do ensaio em presença do enzima tirosinase

A identificação dos metabolitos envolvidos na cinética com o enzima tirosinase, permite-nos propor um mecanismo de ativação dos pró-fármacos com maior certeza e perceber quais os locais da estrutura molecular do pró-fármaco que são mais suscetíveis de ser atacados e que são menos estáveis. Algumas das técnicas que podem ser usadas são: cromatografia líquida associada a um espectrómetro de massa (LC-MS) ou um HPLC preparativo com separação dos compostos e identificação por NMR.

- Aferir a hepatotoxicidade dos pró-fármacos sintetizados

Nos hepatócitos existe uma grande concentração de enzimas monooxigenases que metabolizam compostos aromáticos como os pró-fármacos de MDEPT, que contém grupos fenólicos ou catecóis, que por sua vez resultam em produtos tóxicos. Estes produtos tóxicos podem levar a danos a nível do DNA, proteínas ou outras macromoléculas biológicas que podem resultar na inativação de vias de sinalização e morte de células saudáveis. A hepatotoxicidade dos pró-fármacos pode comprometer desde logo a sua aplicabilidade como pró-fármacos em MDEPT.

- Determinação da citotoxicidade dos pró-fármacos em linhas celulares

A determinação da capacidade dos pró-fármacos conseguirem matar seletivamente as células malignas de melanoma é mais um dos parâmetros que aproximam o uso dos pró-fármacos em MDEPT. Um ensaio viável seria comparar a citotoxicidade dos pró-fármacos em linhas celulares normais/saudáveis versus linhas celulares de melanoma maligno ricas em enzima tirosinase e assim compreender a seletividade dos pró-fármacos para determinadas células. Particularmente, comparar também a atividade citotóxica dos pró-fármacos nas formas livre e lipossomal.



# Bibliografia

## Bibliografia

---

- [1] A. C. Society, "Cancer Facts & Figures," *American Cancer Society*, 2012.
- [2] S. Jawaid, T. H. Khan, H. M. I. Osborn, N. A. O. Williams, "Tyrosinase activated melanoma prodrugs.," *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, vol. 9, nº 7, pp. 717–27, Set. 2009.
- [3] T. L. Diepgen, V. Mahler, "The epidemiology of skin cancer," *British Journal of Dermatology*, vol. 146, pp. 1–6, 2002.
- [4] E. de Vries, J. W. Coebergh, "Cutaneous malignant melanoma in Europe.," *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 40, nº 16, pp. 2355–66, Nov. 2004.
- [5] J. M. Ko, N. F. Velez, H. Tsao, "Pathways to melanoma.," *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, vol. 29, nº 4, pp. 210–7, Dez. 2010.
- [6] B. Kasper, V. D'Hondt, P. Vereecken, A. Awada, "Novel treatment strategies for malignant melanoma: a new beginning?," *Critical reviews in oncology/hematology*, vol. 62, nº 1, pp. 16–22, Abr. 2007.
- [7] <http://www.roche.pt/sites-tematicos/infocancro/index.cfm/tipos/melanoma/>. Consultado Julho 2012
- [8] P. A Riley, "Melanogenesis and melanoma.," *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, vol. 16, nº 5, pp. 548–52, Out. 2003.
- [9] <http://emedical-help.com/tag/melanoma-maligno/>. Consultado Julho 2012
- [10] M. Lind, "Principles of cytotoxic chemotherapy," *Medicine*, vol. 32, nº 3, pp. 20–25, Mar. 2004.
- [11] B. A. Chabner, T. G. Roberts, "Chemotherapy and the war on cancer," *Nat Rev Cancer*, vol. 5, nº 1, pp. 65–72, Jan. 2005.
- [12] G. Xu, H. L. Mcleod, "Strategies for Enzyme / Prodrug Cancer Therapy," *Clinical Cancer Research*, vol. 7, pp. 3314–3324, 2001.
- [13] M. J. Perry, E. Carvalho, E. Rosa, J. Iley, "Towards an efficient prodrug of the alkylating metabolite monomethyltriazene: synthesis and stability of N-acylamino acid derivatives of triazenes.," *European journal of medicinal chemistry*, vol. 44, no. 3, pp. 1049–56, Mar. 2009.
- [14] D. B. Kimball, M. M. Haley, "Triazenes: a versatile tool in organic synthesis.," *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, vol. 41, nº 18, pp. 3338–51, Set. 2002.
- [15] P. Griess, "Ueber eine neue Klasse organischer Verbindungen, in denen Wasserstoff durch Stickstoff vertreten ist," *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, vol. 137, nº 1, pp. 39–91, 1866.

- [16] J. Clarke, Donald A., Barclay, Ralph K., Stock, C. Chester, Rondestvedt, Christian S., "Triazenes as Inhibitors of Mouse Sarcoma 180," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 90, pp. 484–489, 1955.
- [17] F. Marchesi, M. Turriziani, G. Tortorelli, G. Avvisati, F. Torino, L. De Vecchis, "Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems.," *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, vol. 56, n° 4, pp. 275–87, Out. 2007.
- [18] M. R. Middleton, J. J. Grob, N. Aaronson, G. Fierlbeck, W. Tilgen, S. Seiter, M. Gore, S. Aamdal, J. Cebon, A Coates, B. Dreno, M. Henz, D. Schadendorf, a Kapp, J. Weiss, U. Fraass, P. Statkevich, M. Muller, N. Thatcher, "Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma.," *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 18, n° 1, pp. 158–66, Jan. 2000.
- [19] E. Carvalho, A. P. Francisco, J. Iley, E. Rosa, "Triazene drug metabolites. Part 17: Synthesis and plasma hydrolysis of acyloxymethyl carbamate derivatives of antitumour triazenes.," *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 8, n° 7, pp. 1719–25, Jul. 2000.
- [20] G. L. Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry*. Oxford University Press, 2009.
- [21] B. Testa, J. M. Mayer, *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology*. WILEY-VCH, 2003.
- [22] F. Vella, *Fundamentals of medicinal chemistry: Thomas, G.*, vol. 32, n° 3. 2004, pp. 211–211.
- [23] M. J. Wanner, M. Koch, G.-J. Koomen, "Synthesis and antitumor activity of methyltriazene prodrugs simultaneously releasing DNA-methylating agents and the antiresistance drug O(6)-benzylguanine.," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 47, n° 27, pp. 6875–83, Dez. 2004.
- [24] V. I. Nifontov, A. A. Rudnykh, N. P. Belskaya, E. A. Shtpkareva, I. S. Selozneva, "Reactivity and mechanism of the action of triazenes. VI. Triazenes and diazo-compounds as modulators of replicative and repair synthesis of DNA," *Pharmaceutical Chemistry Journal*, vol. 23, n° 4, pp. 288–290, Abr. 1989.
- [25] T.-S. Chang, "An updated review of tyrosinase inhibitors.," *International journal of molecular sciences*, vol. 10, n° 6, pp. 2440–75, Jun. 2009.
- [26] C. Olivares, J. C. García-Borrón, F. Solano, "Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in Mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle.," *Biochemistry*, vol. 41, n° 2, pp. 679–86, Jan. 2002.
- [27] M. Rooseboom, J. A. N. N. M. Commandeur, N. P. E. Vermeulen, "Enzyme-Catalyzed Activation of Anticancer Prodrugs," *Pharmacological Reviews*, vol. 56, n° 1, pp. 53–102, 2004.

## Bibliografia

---

- [28] Y. Matoba, T. Kumagai, A. Yamamoto, H. Yoshitsu, M. Sugiyama, "Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, nº 13, pp. 8981–90, Mar. 2006.
- [29] F. Garc, P. A. Garc, J. Tudela, I. Anovas, "Phenolic substrates and suicide inactivation of tyrosinase :," vol. 440, pp. 431–440, 2008.
- [30] S.-Y. Seo, V. K. Sharma, N. Sharma, "Mushroom tyrosinase: recent prospects.," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 51, nº 10, pp. 2837–53, Maio 2003.
- [31] A. Rescigno, F. Bruyneel, A. Padiglia, F. Sollai, A. Salis, J. Marchand-Brynaert, E. Sanjust, "Structure–activity relationships of various amino-hydroxy-benzenesulfonic acids and sulfonamides as tyrosinase substrates," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1810, nº 8, pp. 799–807, Agosto 2011.
- [32] J. L. Muñoz-Muñoz, F. Garcia-Molina, P. A. Garcia-Ruiz, R. Varon, J. Tudela, J. N. Rodriguez-Lopez, F. Garcia-Canovas, "Catalytic oxidation of o-aminophenols and aromatic amines by mushroom tyrosinase," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, vol. 1814, nº 12, pp. 1974–1983, Dez. 2011.
- [33] A. M. Jordan, T. Khan, H. M. I. Osborn, A. Photiou, P. A. Riley, "Melanocyte-directed enzyme prodrug therapy (MDEPT): development of a targeted treatment for malignant melanoma.," *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 7, nº 9, pp. 1775–80, Set. 1999.
- [34] A. M. Jordan, T. H. Khan, H. Malkin, H. M. I. Osborn, A. Photiou, P. A. Riley, "Melanocyte-Directed enzyme prodrug therapy (MDEPT): development of second generation prodrugs for targeted treatment of malignant melanoma.," *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 9, nº 6, pp. 1549–58, Jun. 2001.
- [35] S. Knaggs, H. Malkin, H. M. I. Osborn, N. A. O. Williams, P. Yaqoob, "New prodrugs derived from 6-aminodopamine and 4-aminophenol as candidates for melanocyte-directed enzyme prodrug therapy (MDEPT).," *Organic & biomolecular chemistry*, vol. 3, nº 21, pp. 4002–10, Nov. 2005.
- [36] M. J. Perry, M. E. Mendes, A. L. Simplicio, A. Coelho, R. V. Soares, J. Iley, R. Moreira, A. P. Francisco, "Dopamine- and tyramine-based derivatives of triazenes: Activation by tyrosinase and implications for prodrug design," *European journal of medicinal chemistry*, vol. 44, pp. 3228–3234, 2009.
- [37] M. J. Perry, E. Mendes, A. L. Simplicio, A. Coelho, R. V. Soares, J. Iley, R. Moreira, A. P. Francisco, "Dopamine- and tyramine-based derivatives of triazenes: activation by tyrosinase and implications for prodrug design.," *European journal of medicinal chemistry*, vol. 44, nº 8, pp. 3228–34, Agosto 2009.
- [38] F. Kratz, I. A. Müller, C. Ryppa, A. Warnecke, "Prodrug Strategies in Anticancer Chemotherapy," *ChemMedChem*, vol. 3, nº 1, pp. 20–53, 2008.
- [39] M. M. Gaspar, "Liposomal formulations of rifabutin and acylated superoxide dismutase," PhD Thesis in Pharmaceutical technology, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2004.

- [40] C. M. Batista, C. Moraes, B. D. Carvalho, N. S. Santos, "Lipossomas e suas aplicações terapêuticas : Estado da arte," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 43, nº 2, pp. 167–179, 2007.
- [41] M. E. M. Cruz, S. I. Simões, M. L. Corvo, M. B. F. Martins, M. M. Gaspar,, "Formulation of NPDDS for Macromolecules," in *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*, Informa Healthcare, 2009, pp. 3–35.
- [42] <http://www.britannica.com/>. Consultado em Julho de 2012
- [43] G. Gregoriadis, B. E. Ryman, "Lysosomal localization of -fructofuranosidase-containing liposomes injected into rats. ," *Biochemical Journal*, vol. 129, nº 1, pp. 120–123, Agosto 1972.
- [44] V. P. Torchilin, "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers.," *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 4, nº 2, pp. 145–60, Fev. 2005.
- [45] M. H. a M. Fens, K. J. Hill, J. Issa, S. E. Ashton, F. R. Westwood, D. C. Blakey, G. Storm, A J. Ryan, R. M. Schiffelers, "Liposomal encapsulation enhances the antitumour efficacy of the vascular disrupting agent ZD6126 in murine B16.F10 melanoma.," *British journal of cancer*, vol. 99, nº 8, pp. 1256–64, Out. 2008.
- [46] S. Šegota, D. Težak, "Spontaneous formation of vesicles," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 121, nº 1–3, pp. 51–75, Set. 2006.
- [47] M. A. Tran, R. J. Watts, G. P. Robertson, "Use of liposomes as drug delivery vehicles for treatment of melanoma.," *Pigment cell & melanoma research*, vol. 22, nº 4, pp. 388–99, Agosto 2009.
- [48] G. Rouser, "Two Dimensional Thin Layer Chromatographic Separation of Polar Lipids and Determination of Phospholipids by Phosphorus Analysis of Spots Values Obtained in Quadruplicate Determinations of Different Amounts of Phosphorus," *Lipids*, vol. 5, nº 5, pp. 494–496, 1969.
- [49] E. Valeur, M. Bradley, "Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents.," *Chemical Society reviews*, vol. 38, nº 2, pp. 606–31, Fev. 2009.
- [50] J. C. Sheehan, G. P. Hess, "A new method of forming peptide bonds," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 77, nº 4, pp. 1067–1068, 1955.
- [51] M. M. Joullié, K. M. Lassen, "Evolution of amide bond formation," *ARKIVOC*, vol. viii, pp. 189–250, 2010.
- [52] S. Kim, J. I. Lee, Y. C. Kim, "A simple and mild esterification method for carboxylic acids using mixed carboxylic-carbonic anhydrides," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 50, nº 5, pp. 560–565, Mar. 1985.
- [53] E. Carvalho, J. Iley, M. J. Perry, E. Rosa, "Triazene Drug Metabolites: Part 15. Synthesis and Plasma Hydrolysis of Anticancer Triazenes Containing Amino Acid Carriers," *Pharmaceutical Research*, vol. 15, nº 6, pp. 931–935, 1998.

## Bibliografia

---

- [54] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, "NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities In the course of the routine use of NMR as an aid for organic chemistry , a day-to-day problem is the identifica-tion of signals deriving from common contaminants literature," vol. 3263, nº 3, pp. 7512–7515, 1997.
- [55] R. M. Silverstein, G. C. Bassler, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 6th Editio., vol. 39, nº 11. Wiley, 1998.
- [56] S. Balalaie, M. Mahdidoust, R. Eshaghi-Najafabadi, "2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium Tetrafluoro Borate ( TBTU ) as an Efficient Coupling Reagent for the Amidation and Phenylhydrazation of Carboxylic Acids at Room Temperature," *Journal of the Iranian Chemical Society*, vol. 4, nº 3, pp. 364–369, 2007.
- [57] A. R. Katritzky, S. K. Singh, C. Cai, S. Bobrov, "Direct synthesis of esters and amides from unprotected hydroxyaromatic and -aliphatic carboxylic acids.," *The Journal of organic chemistry*, vol. 71, nº 9, pp. 3364–74, Abr. 2006.
- [58] G. Storm, D. J. A. Crommelin, G. W. Bos, "Liposomes – Successful Carrier Systems for Targeted Delivery of Drugs," *Business Briefing: Pharmatech*, pp. 209–213, 2003.
- [59] A. S. Ulrich, "Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles.," *Bioscience reports*, vol. 22, nº 2, pp. 129–50, Maio 2002.
- [60] M. J. Perry, "Desenvolvimento de pró-fármacos de triazenos anti-tumorais usando amino-ácidos como transportadores," Tese de Doutorado, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2002.
- [61] H. Maskill, *The Physical Basis of Organic Chemistry*, vol. 99, nº 4. Oxford, UK: , 1985.
- [62] K. Boekelheide, D. G. Graham, P. D. Mize, P. W. Jeffs, "The metabolic pathway catalyzed by the tyrosinase of *Agaricus bisporus*.,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 255, nº 10, pp. 4766–4771, Maio 1980.
- [63] L. G. Fenoll, J. N. Rodríguez-López, F. García-Sevilla, P. A. García-Ruiz, R. Varón, F. García-Cánovas, J. Tudela, "Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable o-quinones," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1548, nº 1, pp. 1–22, Jul. 2001.
- [64] L. G. Fenoll, J. N. Rodríguez-López, R. Varón, P. A. García-Ruiz, F. García-Cánovas, and J. Tudela, "Kinetic characterisation of the reaction mechanism of mushroom tyrosinase on tyramine/dopamine and l-tyrosine methyl ester/l-dopa methyl ester," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 34, nº 12, pp. 1594–1607, Dez. 2002.
- [65] <http://www.vcclab.org/lab/alogps/>. Consultado em Julho de 2012
- [66] S. Kudugunti, N. Vad, E. Ekogbo, M. Moridani, "Efficacy of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) in skin B16-F0 melanoma tumor bearing C57BL/6 mice," *Investigational New Drugs*, vol. 29, nº 1, pp. 52–62, Fev. 2011.

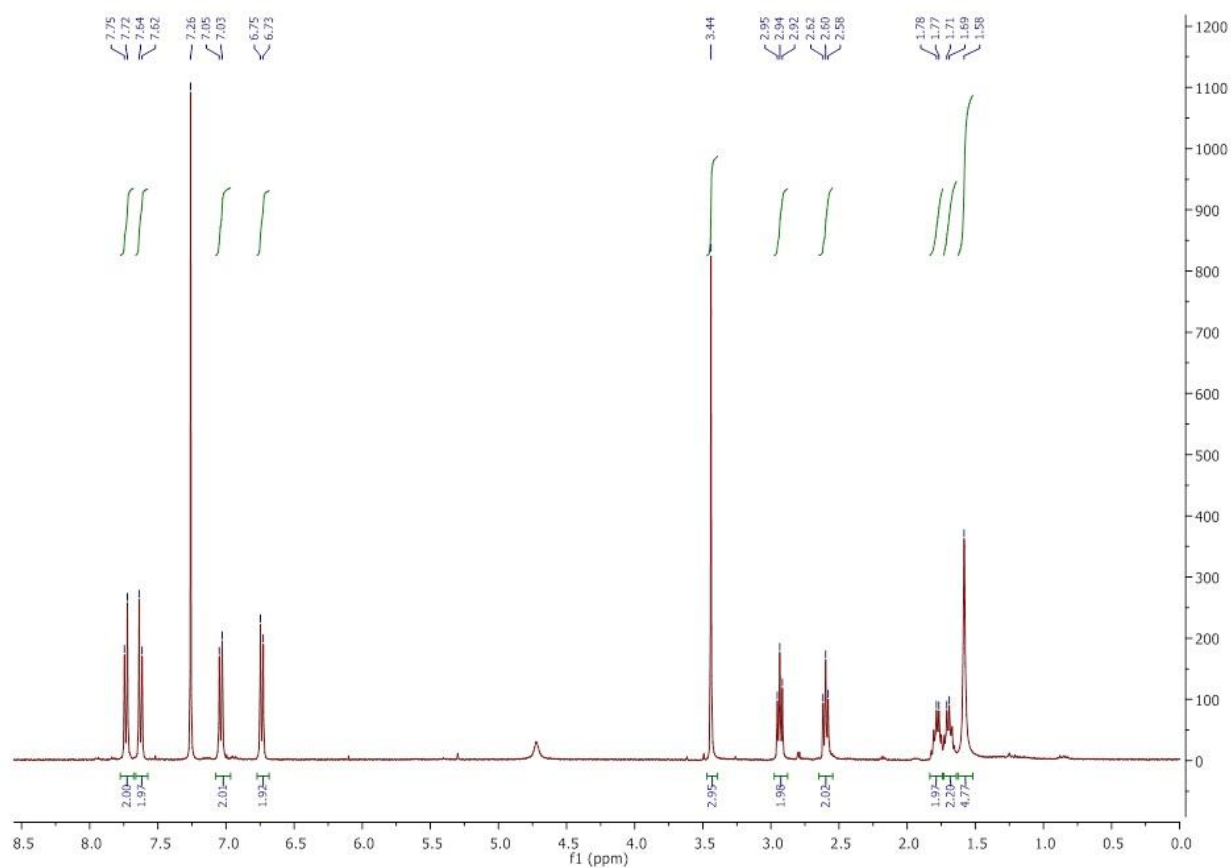


- [67] N. M. Vad, P. K. Kandala, S. K. Srivastava, M. Y. Moridani, "Structure–toxicity relationship of phenolic analogs as anti-melanoma agents: An enzyme directed prodrug approach," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 183, nº 3, pp. 462–471, Fev. 2010.
- [68] R. E. Eliaz, S. Nir, C. Marty, F. C. Szoka, "Determination and Modeling of Kinetics of Cancer Cell Killing by Doxorubicin and Doxorubicin Encapsulated in Targeted Liposomes," *Cancer Research*, vol. 64, nº 2, pp. 711–718, Jan. 2004.
- [69] D. C. Drummond, O. Meyer, K. Hong, D. B. Kirpotin, D. Papahadjopoulos, "Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors.," *Pharmacological reviews*, vol. 51, nº 4, pp. 691–743, Dez. 1999.

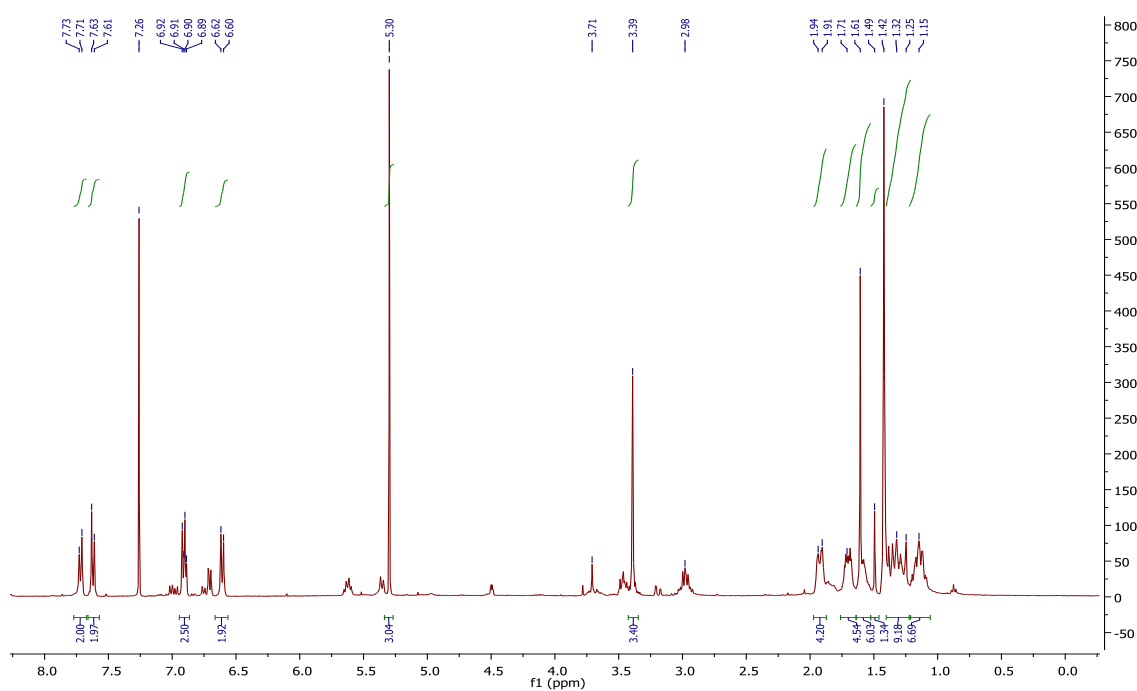


# Anexos

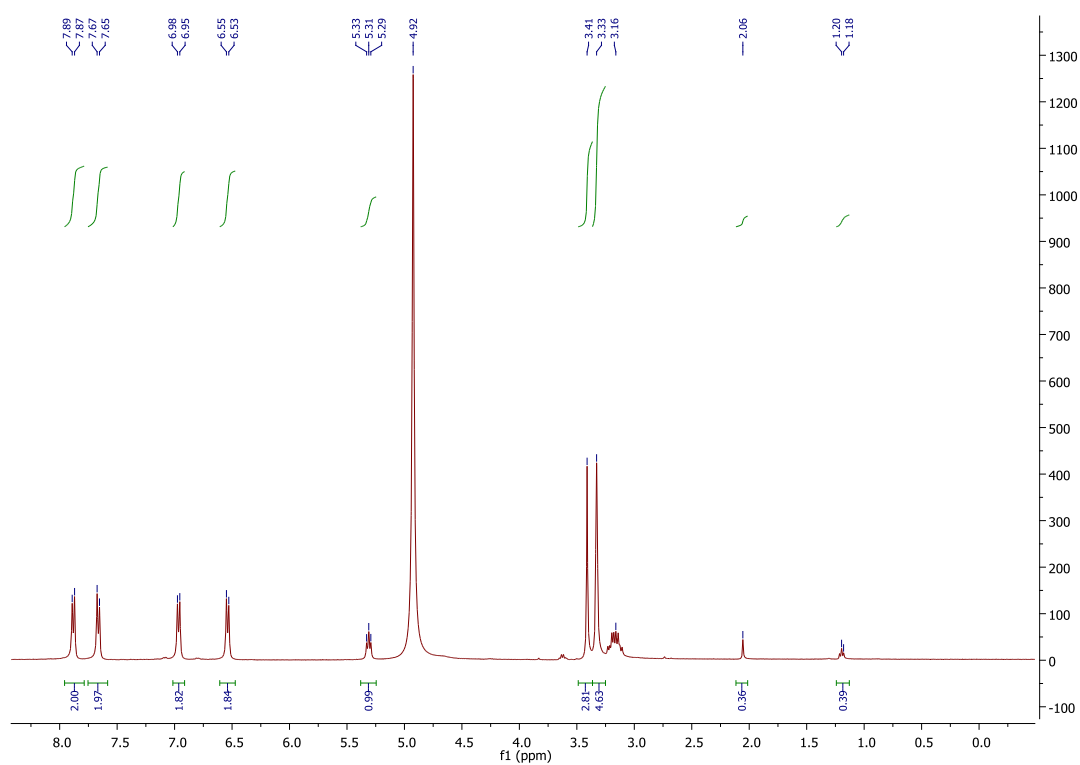
## Anexo I



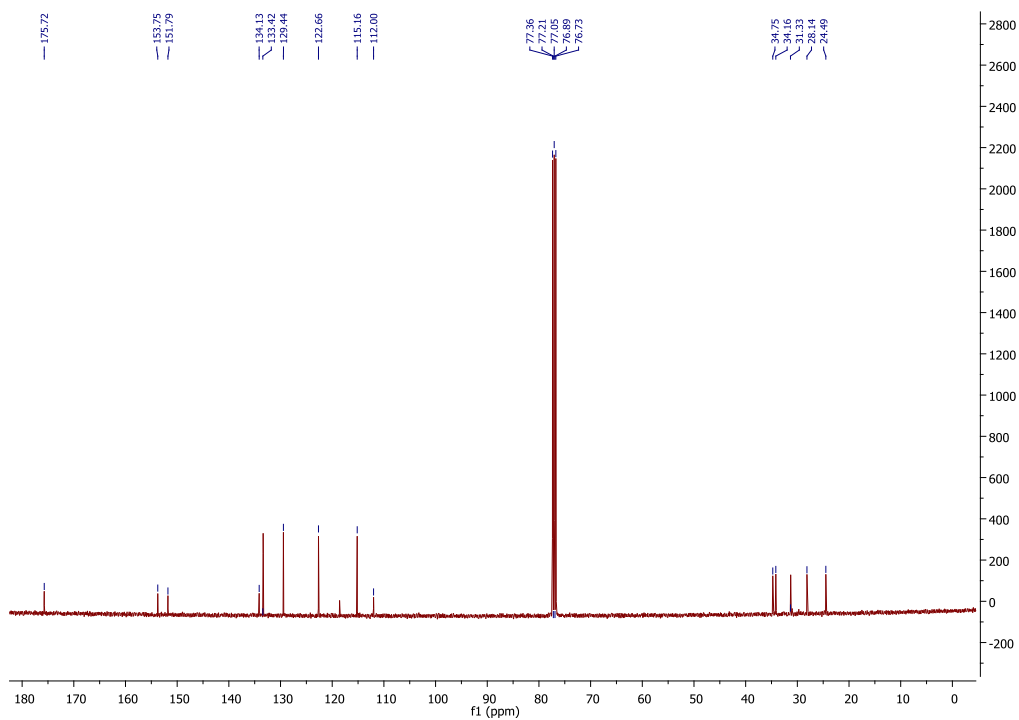
**Figura A.1** – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do pró-fármaco **18a**



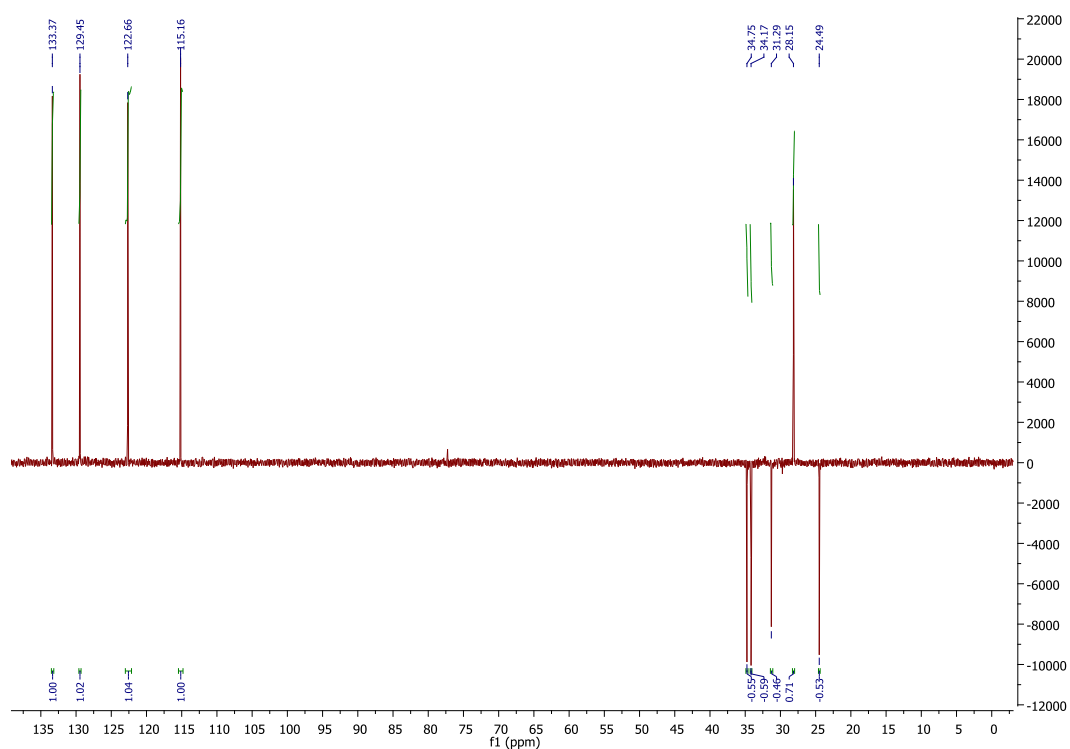
**Figura A.2** – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do pró-fármaco **19a**



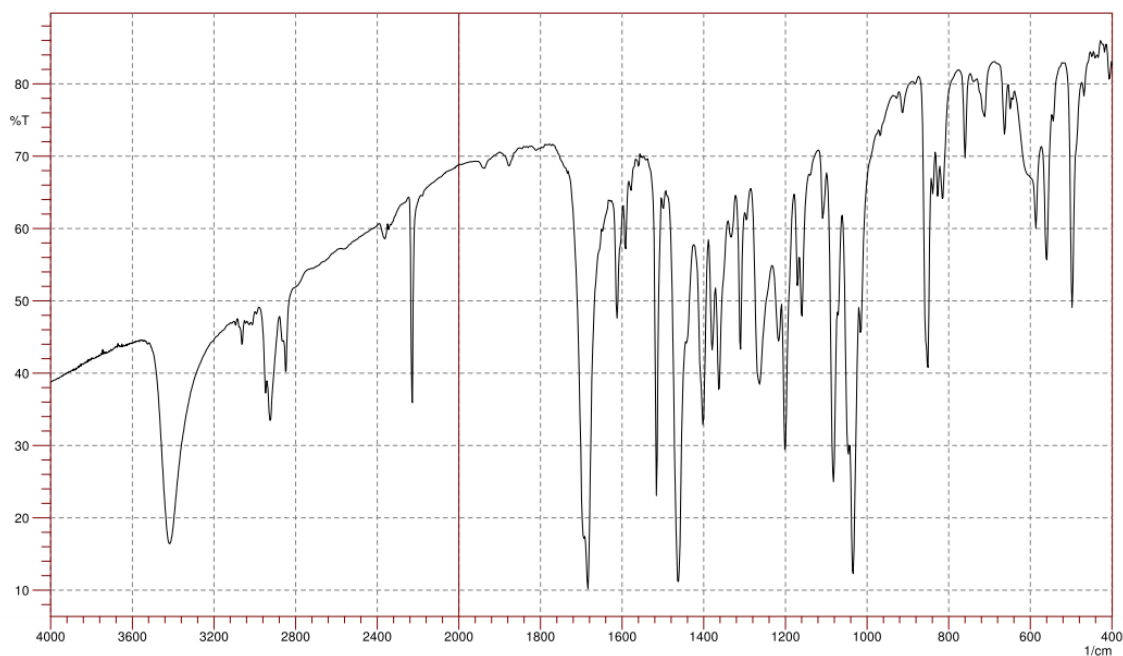
**Figura A.3 – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do pró-fármaco 20a**



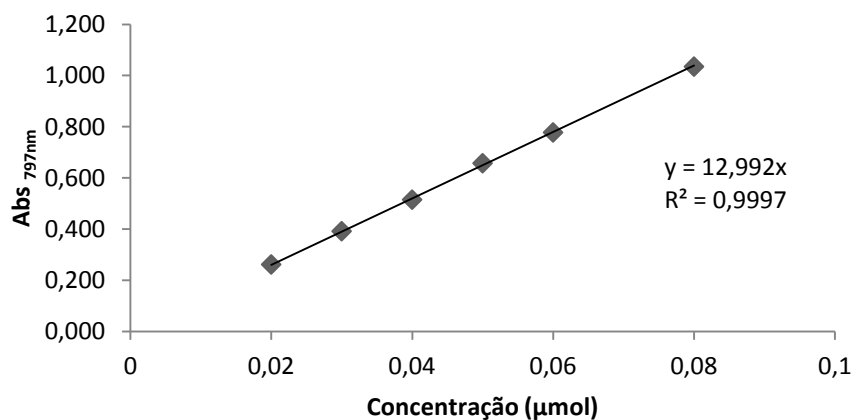
**Figura A.4 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do pró-fármaco 18a**



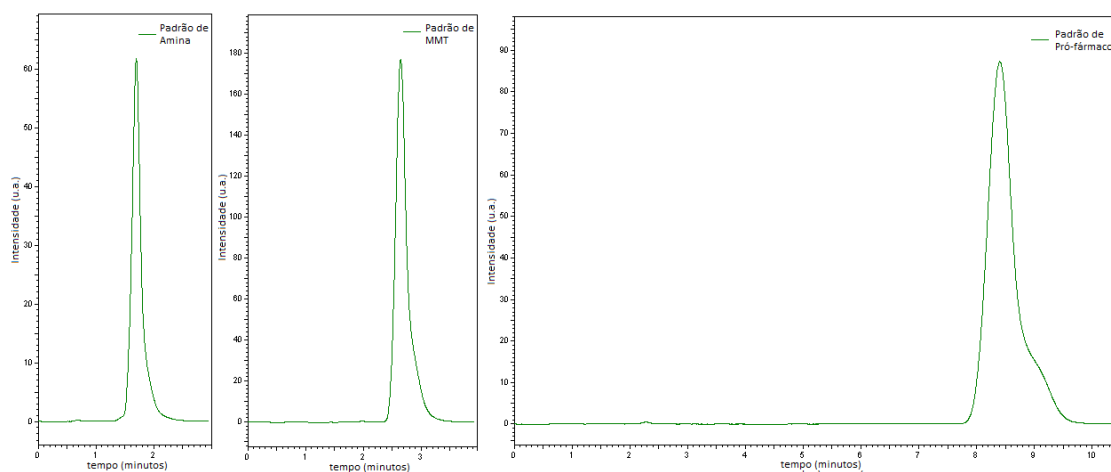
**Figura A.5 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -DEPT-135-RMN do pró-fármaco 18a**



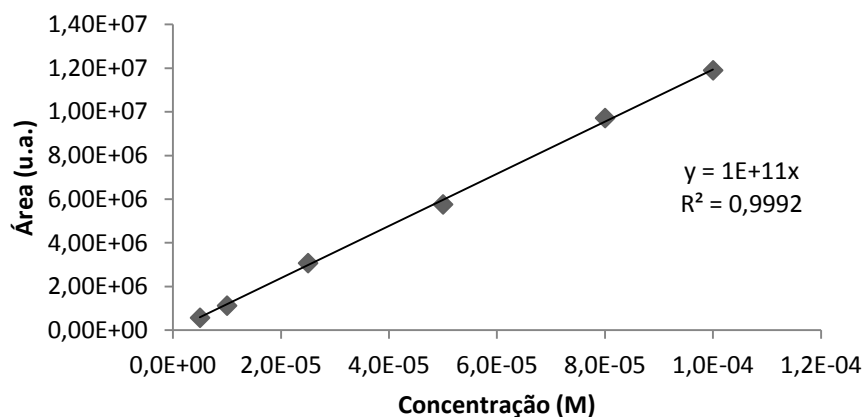
**Figura A.6 – Espectro de FTIR do pró-fármaco 18a**



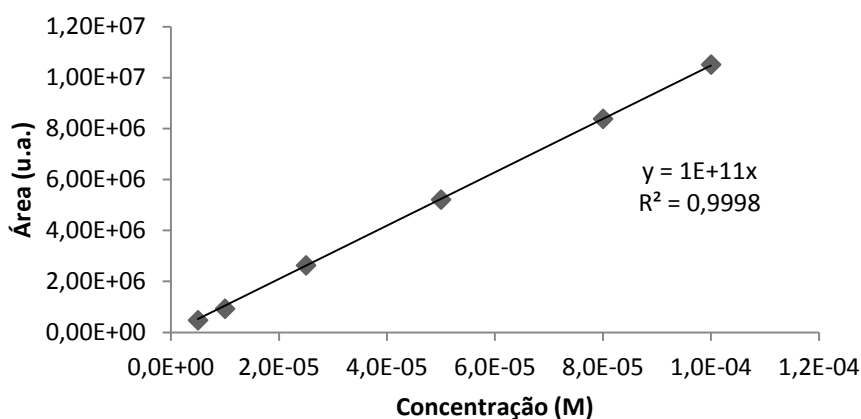
**Figura A.7** – Representação gráfica da reta de calibração para a quantificação de fosfolípidos.



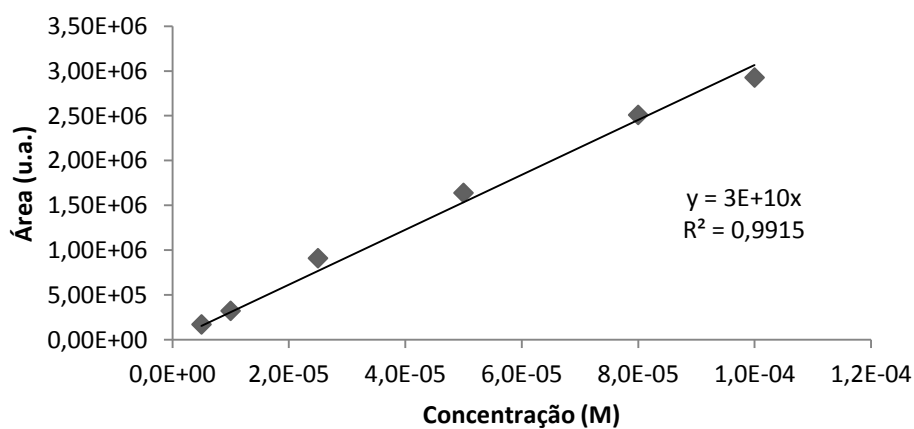
**Figura A.8** – Cromatogramas dos padrões do pró-fármaco **18a**, CN-MMT e CN-Amina.



**Figura A.9** – Representação gráfica da reta de calibração do pró-fármaco 18a.

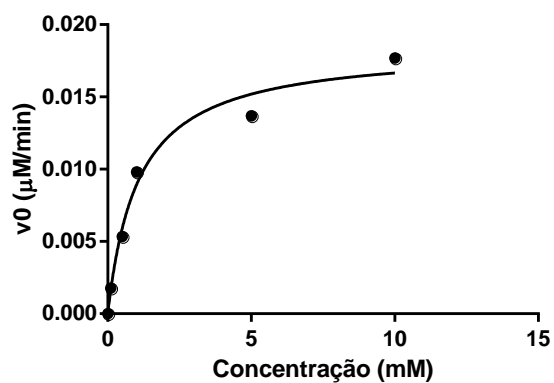


**Figura A.10** – Representação gráfica da reta de calibração do CN-MMT correspondente ao pró-fármaco 18a.



**Figura A.11** – Representação gráfica da reta de calibração da CN-Amina correspondente ao pró-fármaco 18a.





**Figura A.12** – Regressão não-linear de Michaelis-Menten para determinação do  $K_m$  e  $V_{max}$  resultante do ensaio cinético do pró-fármaco **18d** em presença do enzima tirosinase a 37 °C.

## Anexo II

Poster apresentado no *6th Spanish-Portuguese-Japanese Organic Chemistry Symposium* em julho de 2012, com o título de: "*Synthesis and evaluation of triazene prodrugs as candidates for Melanocyte-Directed Enzyme Prodrug Therapy.*"

Sousa A, Perry MJP, Francisco AP, Gaspar MM, Calado S, Pamplona MT, Mendes E.